



PATENT APPLICATION

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

In re application of

Docket No: Q78242

Hiroki NAKAJIMA

Appln. No.: 10/697,036

Group Art Unit: 1652

Confirmation No.: 8374

Examiner: Unknown

Filed: October 31, 2003

For: TRANSFORMED CELL WITH ENHANCED SENSITIVITY TO ANTIFUNGAL
COMPOUND AND USE THEREOF

SUBMISSION OF PRIORITY DOCUMENT

Commissioner for Patents
P.O. Box 1450
Alexandria, VA 22313-1450

Sir:

Submitted herewith is a certified copy of the priority document on which a claim to
priority was made under 35 U.S.C. § 119. The Examiner is respectfully requested to
acknowledge receipt of said priority document.

Respectfully submitted,

Mark L. Hayman
Registration No. 51,793

SUGHRUE MION, PLLC
Telephone: (202) 293-7060
Facsimile: (202) 293-7860

WASHINGTON OFFICE

23373

CUSTOMER NUMBER

Enclosures: Japan 2002-317736

Date: March 26, 2004

日 本 国 特 許 庁
JAPAN PATENT OFFICE

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日 2 0 0 2 年 1 0 月 3 1 日
Date of Application:

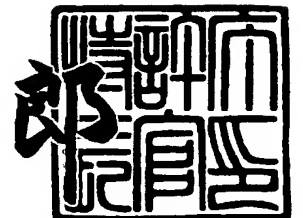
出 願 番 号 特 願 2 0 0 2 - 3 1 7 7 3 6
Application Number:
[ST. 10/C] : [J P 2 0 0 2 - 3 1 7 7 3 6]

出 願 人 住 友 化 学 工 業 株 式 会 社
Applicant(s):

2 0 0 3 年 7 月 1 0 日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

太田信一郎



【書類名】 特許願

【整理番号】 P154967

【提出日】 平成14年10月31日

【あて先】 特許庁長官殿

【国際特許分類】 C12N 1/00
C12N 15/00

【発明者】

【住所又は居所】 兵庫県宝塚市高司 4 丁目 2 番 1 号 住友化学工業株式会社
社内

【氏名】 中島 寛樹

【特許出願人】

【識別番号】 000002093

【氏名又は名称】 住友化学工業株式会社

【代理人】

【識別番号】 100093285

【弁理士】

【氏名又は名称】 久保山 隆

【電話番号】 06-6220-3405

【選任した代理人】

【識別番号】 100113000

【弁理士】

【氏名又は名称】 中山 亨

【電話番号】 06-6220-3405

【選任した代理人】

【識別番号】 100119471

【弁理士】

【氏名又は名称】 榎本 雅之

【電話番号】 06-6220-3405

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 010238

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 要約書 1

【包括委任状番号】 0212949

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 抗菌活性物質に対する感受性が増強された形質転換細胞及びその利用

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

少なくとも 1 つ以上のハイブリッドセンサーキナーゼを欠損した細胞に、細胞膜貫通領域を有さない浸透圧感受性ヒスチジンキナーゼのアミノ酸配列をコードする塩基配列からなる遺伝子が機能可能な形で導入されてなることを特徴とする形質転換細胞。

【請求項 2】

細胞が微生物であることを特徴とする請求項 1 記載の形質転換細胞。

【請求項 3】

微生物が出芽酵母であることを特徴とする請求項 1 記載の形質転換細胞。

【請求項 4】

細胞膜貫通領域を有さない浸透圧感受性ヒスチジンキナーゼのアミノ酸配列をコードする塩基配列からなる遺伝子が、ジカルボキシイミド系抗菌活性物質、芳香族炭化水素系抗菌活性物質又はフェニルピロール系抗菌活性物質のいずれかに対する抵抗性変異を有するヒスチジンキナーゼであり、かつ細胞膜貫通領域を有さない浸透圧感受性であるヒスチジンキナーゼのアミノ酸配列をコードする塩基配列からなる遺伝子であることを特徴とする請求項 1 記載の形質転換細胞。

【請求項 5】

細胞膜貫通領域を有さない浸透圧感受性ヒスチジンキナーゼが、植物病原糸状菌由来である、細胞膜貫通領域を有さない浸透圧感受性ヒスチジンキナーゼであることを特徴とする請求項 1 記載の形質転換細胞。

【請求項 6】

細胞膜貫通領域を有さない浸透圧感受性ヒスチジンキナーゼが、灰色カビ病糸状菌又はイネいもち病糸状菌由来である、細胞膜貫通領域を有さない浸透圧感受性ヒスチジンキナーゼであることを特徴とする請求項 1 の記載の形質転換細胞。

【請求項 7】

細胞膜貫通領域を有さない浸透圧感受性ヒスチジンキナーゼのアミノ酸配列が、配列番号 1 又は配列番号 16 に示されるアミノ酸配列であることを特徴とする請求項 1 記載の形質転換細胞。

【請求項 8】

細胞膜貫通領域を有さない浸透圧感受性ヒスチジンキナーゼのアミノ酸配列をコードする塩基配列が、配列番号 2 又は配列番号 17 に示される塩基配列であることを特徴とする請求項 1 記載の形質転換細胞。

【請求項 9】

物質の抗菌活性検定方法であって、
請求項 1 記載の形質転換細胞に被験物質を接触させる第一工程、
前記第一工程後、前記形質転換細胞を培養する第二工程、
前記第二工程で培養された形質転換細胞内で発現された細胞膜貫通領域を有さない浸透圧感受性ヒスチジンキナーゼからの細胞内信号伝達量又はそれに相関関係を有する指標値を測定する第三工程、
前記第三工程で測定された細胞内信号伝達量又はそれに相関関係を有する指標値と、対照との差異に基づき前記被験物質の抗菌活性を評価する第四工程、
を有することを特徴とする検定方法。

【請求項 10】

細胞膜貫通領域を有さない浸透圧感受性ヒスチジンキナーゼからの細胞内信号伝達量又はそれに相関関係を有する指標値が、前記形質転換細胞の生育量であることを特徴とする請求項 9 記載の検定方法。

【請求項 11】

請求項 9 記載の検定方法で評価された抗菌活性に基づき抗菌活性物質を選抜することを特徴とする抗菌活性物質の探索方法。

【請求項 12】

請求項 11 記載の探索方法で選抜された抗菌活性物質。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、抗菌活性物質に対する感受性が増強した形質転換細胞及びその利用等に関する。

【0002】

【従来の技術】

ジカルボキシイミド系抗菌活性物質、芳香族炭化水素系抗菌活性物質、及びフェニルピロール系抗菌活性物質等を有効成分として含有する殺菌剤は、ある種の植物病原糸状菌類に作用させると、高浸透圧ストレスを受けた場合のように細胞内のグリセロール合成が亢進し、細胞内浸透圧を制御できずに死滅することが知られている。このような植物病原糸状菌類に対する作用性から、これらの殺菌剤に有効成分として含有される抗菌活性物質の標的蛋白質として浸透圧制御に関わる情報伝達系の蛋白質が予想された。

上記の抗菌活性物質に感受性を示すアカパンカビ (*Neurospora crassa*) で、浸透圧感受性を有する変異株 *os-1* が報告された。この変異株 *os-1* は、上記の抗菌活性物質に対して抵抗性を示し、当該変異株の解析によって原因遺伝子として浸透圧感受性ヒスチジinkinase 遺伝子である *OS-1* 遺伝子が単離された。この *OS-1* 遺伝子の塩基配列にコードされるアミノ酸配列を有する蛋白質は、2成分制御系のヒスチジinkinase の構造を有するとともに、互いにアミノ酸配列の相同性を有する約90アミノ酸からなるポリペプチドが6回繰返し存在する特徴的な配列領域（以下、繰返し配列領域と記すこともある。）を有する蛋白質であった（例えば、特許文献1、非特許文献1、非特許文献2、非特許文献3、非特許文献5、非特許文献6参照。）。*OS-1* 遺伝子に対して相同性を有する遺伝子が、灰色カビ病糸状菌 (*Botryotinia fuckeliana*)、イネいもち病糸状菌 (*Magnaporthe grisea*)、エンドウ根腐病糸状菌 (*Fusarium solani*) 等の植物病原糸状菌類からも単離され、塩基配列及びアミノ酸配列が公開されている。このように、*OS-1* 遺伝子に対して相同遺伝子群は真核細胞生物でも糸状菌類に特異的に存在することが知られている（例えば、非特許文献4、非特許文献7、非特許文献8参照。）。

【0003】

【特許文献1】

米国特許第5,939,306号

【非特許文献 1】

GneneBank accession U50263, U53189, AAB03698, AAB01979

【非特許文献 2】

Alex, A.L. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:3416-3421

【非特許文献 3】

Schumacher, M.M. et al., Current Microbiology 34:340-347

【非特許文献 4】

GneneBank accession AF396827, AF435964, AAL37947, AAL30826

【非特許文献 5】

Oshima, M. et al., Phytopathology 92(1):75-80

【非特許文献 6】

Fujimura, M. et al., J. Pesticide Sci. 25:31-36

【非特許文献 7】

Fujimura, M. et al., Pesticide Biochem. Physiol. 67:125-133

【非特許文献 8】

GneneBank accession AB041647, BAB40497

【 0 0 0 4】

【発明が解決しようとする課題】

【 0 0 0 5】

【発明が解決しようとする課題】

このように、OS-1蛋白質及びその当該蛋白質に対して相同性を有する蛋白質群は、糸状菌類に特異的な蛋白質であり、浸透圧制御に関わる重要な蛋白質であることから、抗菌活性物質の標的蛋白質として極めて有用であると考え、当該推測に基づきOS-1遺伝子及び当該遺伝子に対して相同性を有する遺伝子を用いた新たな抗菌活性検定方法や抗菌活性物質を効率的に選抜する方法等の開発を試みた。

【 0 0 0 6】

【課題を解決するための手段】

このような状況下、発明者は鋭意検討を行った結果、抗菌活性物質に対する感受性が増強された形質転換細胞を見出し、この形質転換細胞を用いた新規な抗菌活

性の検定方法、及び、この形質転換細胞を用いた抗菌活性物質を選抜する方法を見出し、本発明に至った。

【0007】

即ち、本発明は、

1. 少なくとも1つ以上のハイブリッドセンサーキナーゼを欠損した細胞に、細胞膜貫通領域を有さない浸透圧感受性ヒスチジンキナーゼのアミノ酸配列をコードする塩基配列からなる遺伝子が機能可能な形で導入されてなることを特徴とする形質転換細胞；
2. 細胞が微生物であることを特徴とする前項1記載の形質転換細胞；
3. 微生物が出芽酵母であることを特徴とする前項1記載の形質転換細胞；
4. 細胞膜貫通領域を有さない浸透圧感受性ヒスチジンキナーゼのアミノ酸配列をコードする塩基配列からなる遺伝子が、ジカルボキシイミド系抗菌活性物質、芳香族炭化水素系抗菌活性物質又はフェニルピロール系抗菌活性物質のいずれかに対する抵抗性変異を有するヒスチジンキナーゼであり、かつ細胞膜貫通領域を有さない浸透圧感受性であるヒスチジンキナーゼのアミノ酸配列をコードする塩基配列からなる遺伝子であることを特徴とする前項1記載の形質転換細胞；
5. 細胞膜貫通領域を有さない浸透圧感受性ヒスチジンキナーゼが、植物病原糸状菌由来である、細胞膜貫通領域を有さない浸透圧感受性ヒスチジンキナーゼであることを特徴とする前項1記載の形質転換細胞；
6. 細胞膜貫通領域を有さない浸透圧感受性ヒスチジンキナーゼが、灰色カビ病糸状菌又はイネいもち病糸状菌由来である、細胞膜貫通領域を有さない浸透圧感受性ヒスチジンキナーゼであることを特徴とする前項1の記載の形質転換細胞；
7. 細胞膜貫通領域を有さない浸透圧感受性ヒスチジンキナーゼのアミノ酸配列が、配列番号1又は配列番号16に示されるアミノ酸配列であることを特徴とする前項1記載の形質転換細胞；
8. 細胞膜貫通領域を有さない浸透圧感受性ヒスチジンキナーゼのアミノ酸配列をコードする塩基配列が、配列番号2又は配列番号17に示される塩基配列であることを特徴とする前項1記載の形質転換細胞；
9. 物質の抗菌活性検定方法であって、

- (1) 前項1記載の形質転換細胞に被験物質を接触させる第一工程、
 - (2) 前記第一工程後、前記形質転換細胞を培養する第二工程、
 - (3) 前記第二工程で培養された形質転換細胞内で発現された細胞膜貫通領域を有さない浸透圧感受性ヒスチジンキナーゼからの細胞内信号伝達量又はそれに相関関係を有する指標値を測定する第三工程、
 - (4) 前記第三工程で測定された細胞内信号伝達量又はそれに相関関係を有する指標値と、対照との差異に基づき前記被験物質の抗菌活性を評価する第四工程、を有することを特徴とする検定方法；
10. 細胞膜貫通領域を有さない浸透圧感受性ヒスチジンキナーゼからの細胞内信号伝達量又はそれに相関関係を有する指標値が、前記形質転換細胞の生育量であることを特徴とする前項9記載の検定方法；
11. 前項9記載の検定方法で評価された抗菌活性に基づき抗菌活性物質を選抜することを特徴とする抗菌活性物質の探索方法；
12. 前項11記載の探索方法で選抜された抗菌活性物質；
- 等を提供するものである。

【0008】

【発明の実施の形態】

以下、詳細に本発明を説明する。

「少なくとも1つ以上のハイブリッドセンサーキナーゼを欠損した細胞に、細胞膜貫通領域を有さない浸透圧感受性ヒスチジンキナーゼのアミノ酸配列をコードする塩基配列からなる遺伝子が機能可能な形で導入されてなることを特徴とする形質転換細胞」は、宿主細胞である、「少なくとも1つ以上のハイブリッドセンサーキナーゼを欠損した細胞」に、「細胞膜貫通領域を有さない浸透圧感受性ヒスチジンキナーゼ」のアミノ酸配列をコードする塩基配列からなる遺伝子を機能可能な形で導入することによって得られる。「少なくとも1つ以上のハイブリッドセンサーキナーゼを欠損した細胞」は、宿主細胞が本来有している少なくとも1つ以上のハイブリッドセンサーキナーゼを、欠損させることによって得られる。まず、以下に、ハイブリッドセンサーキナーゼについて説明する。

【0009】

(2成分制御系とハイブリッドセンサーキナーゼ)

2成分制御系(Two-component regulatory system)は、原核細胞生物で広く用いられている情報伝達系であり、基本的にはセンサーとレギュレーターと呼ばれる2つの蛋白質より構成されることから2成分制御系と呼ばれている。典型的な2成分制御系では、センサー蛋白質はインプット領域とヒスチジンキナーゼ領域とからなり、レギュレーター蛋白質はレシーバー領域とアウトプット領域とから構成される。インプット領域が外界からの刺激を感知すると、ヒスチジンキナーゼ領域の生物種間でよく保存されたアミノ酸配列中のヒスチジン残基がリン酸化、或いは、脱リン酸化される。ここで、ヒスチジン残基のリン酸化はATPを基質とする自己リン酸化反応である。このリン酸基はレギュレーター蛋白質におけるレシーバー領域の生物種間でよく保存されたアミノ酸配列中のアスパラギン酸残基に転移され、このアスパラギン酸残基のリン酸化の有無がレギュレーター蛋白質におけるアウトプット領域の活性を調節している。原核細胞生物の場合、例外もあるが、アウトプット領域は転写調節因子であることが多く、センサー蛋白質が感知した刺激に対して、前述のリン酸基転移を介してレギュレーター蛋白質が遺伝子発現を直接的に制御している。

センサー蛋白質は、前記の典型的な構造とは異なり、もう少し複雑な構造をとる場合もある。例えば、インプット領域とヒスチジンキナーゼ領域とからなる構造に加えて、C末端側にレギュレーター蛋白質に見られるレシーバー領域が続けて存在する場合がある。この場合は、リン酸基の転移様式も複雑になり、センサー蛋白質から、フォスフォトランスミッターと呼ばれるトランスミッター領域を有する仲介蛋白質を経て、レスポンスレギュレーターと呼ばれるレギュレーター蛋白質にリン酸基転移をすることが知られている。即ち、センサー蛋白質のインプット領域で刺激を感知すると、同分子内のヒスチジンキナーゼ領域のヒスチジン残基から、同分子内のレシーバー領域のアスパラギン酸残基へ、次いで、フォスフォトランスミッターのヒスチジン残基、最後に、レスポンスレギュレーターのレシーバー領域のアスパラギン酸残基へとリン酸基転移の信号伝達がなされる。このように、2成分制御系には3つの蛋白質が関与している場合もある。このような3つの蛋白質からなるリン酸基転移の信号伝達に関与し、前記の構造的な特徴

を有するセンサー蛋白質を「ハイブリッドセンサーキナーゼ」という。

ここで、ハイブリッドセンサーキナーゼのインプット領域とは、ヒスチジンキナーゼ領域のN末端側に存在する領域であって、多くの場合には細胞膜貫通領域を有する。この細胞膜貫通領域は、例えば、http://www.ch.embnet.org/software/TMPRED_form.html から利用可能である構造予測ソフトウェア等を用いて膜貫通領域の構造を推定することができる。また、ハイブリッドセンサーキナーゼのヒスチジンキナーゼ領域とは、例えば、インプット領域のC末端側に存在する領域であって、Parkinson, J.S. & Kofoed, E.C. (1989) *Annual Review of Genetics* 23:311-336、Stock, J.B. et.al. (1989) *Microbiological Reviews* 53(4):450-490に記載のように一般的なヒスチジンキナーゼに共通の5つの保存モチーフを有することを特徴とする領域であり、例えば、出芽酵母のハイブリッドセンサーキナーゼSLN1では556番目のアミノ酸から908番目のアミノ酸までの領域である。ハイブリッドセンサーキナーゼのレシーバー領域とは、例えば、ヒスチジンキナーゼ領域のC末端側に存在する領域であって、Parkinson, J.S. & Kofoed, E.C. *Annual Review of Genetics* 23:311-336(1989)、Stock, J.B. et.al. (1989) *Microbiological Reviews* 53(4):450-490に記載のように一般的なヒスチジンキナーゼに共通の3つの保存モチーフを有することを特徴とする領域であり、例えば、出芽酵母のハイブリッドセンサーキナーゼSLN1では1088番目のアミノ酸から1197番目のアミノ酸までの領域である。

レスポンスレギュレーター以降の情報伝達も、複雑な場合には、前記のようにレギュレーターのアウトプット領域が転写調節因子であるような簡略な系以外に、細胞内で様々な制御に関わるMAPキナーゼカスケードを介して、遺伝子の発現制御を司る転写調節因子へ信号伝達される場合も知られている。

ハイブリッドセンサーキナーゼは、原核細胞生物だけでなく、酵母等の真核細胞生物である微生物又は植物に存在し、様々な刺激やストレスに対する応答に関与している。以下に具体的なハイブリッドセンサーキナーゼとハイブリッドセンサーキナーゼが関与する情報伝達の例を挙げて説明する。

【0010】

(出芽酵母のハイブリッドセンサーキナーゼ)

出芽酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)は浸透圧制御に関わる情報伝達にハイブリッドセンサーキナーゼSLN1を用いている。このSLN1は出芽酵母では唯一のヒスチジンキナーゼである。SLN1はインプット領域に細胞膜貫通領域を有する浸透圧感受性ヒスチジンキナーゼであり、フォスフォトランスミッターYPD1を介して、レスポンスレギュレーターSSK1にリン酸基転移信号を伝達することが知られている。この信号伝達の下流には3つのキナーゼSSK2 (MAPKKK)、PBS2(MAPKK)及びHOG1(MAPK)からなるMAPキナーゼカスケードが存在し、グリセロール生合成等の浸透圧適応に関わる遺伝子発現を制御している。レスポンスレギュレーターSSK1のアウトプット領域はSSK2のリン酸化活性を有している。SSK1はレシーバー領域のアスパラギン酸残基がリン酸化されることによって、アウトプット領域のリン酸化活性が阻害され、負の制御を受けている。具体的には、通常の浸透圧ではSLN1のヒスチジンキナーゼ領域のヒスチジン残基が自己リン酸化され、このリン酸基が、同分子内のレシーバー領域のアスパラギン酸残基、YPD1のヒスチジン残基、最後にSSK1のレシーバー領域のアスパラギン酸残基に転移する。SSK1のレシーバー領域中のアスパラギン酸残基がリン酸化されることによって、SSK1のアウトプット領域のリン酸化活性が抑制され、SSK2、PBS2及びHOG1からなるMAPキナーゼカスケードのリン酸転移が行われないうえに、グリセロール生合成等の浸透圧適応に関わる遺伝子発現が誘導されない状態にある。一方、高浸透圧条件になると、SLN1においてヒスチジンキナーゼ領域のヒスチジン残基の自己リン酸化が停止するために、SSK2、PBS2及びHOG1からなるMAPキナーゼカスケードが活性化し、グリセロール生合成等の浸透圧適応に関わる遺伝子発現が誘導されることが知られている(Maeda, T. et. al. (1994) Nature 369:242-245)。

【0011】

(分裂酵母のハイブリッドセンサーキナーゼ)

分裂酵母(*Schizosaccharomyces pombe*)では、細胞周期の制御(G2期からM期への移行)や酸化ストレス応答に3種類のハイブリッドセンサーキナーゼPHK1(MAK2)、PHK2(MAK3)及びPHK3(MAK1)が関与している。分裂酵母にはPHK1、PHK2及びPHK3以外にヒスチジンキナーゼが存在しない。PHK1及びPHK2は過酸化水素等の酸化ストレス応答性のヒスチジンキナーゼである(Buck, V. et. al. Mol. Biol. Cell 12:40

7-419)。3種類のハイブリッドセンサーキナーゼPHK1、PHK2及びPHK3は、フォスフォトランスミッターSPY1(MPR1)を介して、レスポンスレギュレーターMCS4にリン酸基転移信号を伝達することが知られている。この信号伝達の下流には3つのキナーゼWAK1 (MAPKKK)、WIS1(MAPKK)及びSTY1(MAPK)からなるMAPキナーゼカスケードが存在し、細胞周期の制御や酸化ストレス応答に関わる遺伝子発現を制御している。レスポンスレギュレーターMCS4のアウトプット領域はWAK1のリン酸化活性を有している。MCS4はレシーバー領域のアスパラギン酸残基がリン酸化されることによって、アウトプット領域のリン酸化活性が阻害され、負の制御を受けている。具体的には、通常条件ではPHK1～3のヒスチジンキナーゼ領域のヒスチジン残基が自己リン酸化され、このリン酸基が、同分子内のレシーバー領域のアスパラギン酸残基、SPYのヒスチジン残基、最後にMCS4のレシーバー領域のアスパラギン酸残基に転移する。MCS4のレシーバー領域中のアスパラギン酸残基がリン酸化されることによって、MCS4のアウトプット領域のリン酸化活性が抑制され、WAK1、WIS1及びSTY1からなるMAPキナーゼカスケードのリン酸転移が行われなため、細胞周期の制御やストレス応答に関わる遺伝子発現が誘導されない状態にある。一方、ストレス条件下では、PHK1～3においてヒスチジンキナーゼ領域のヒスチジン残基の自己リン酸化が停止するために、WAK1、WIS1及びSTY1からなるMAPキナーゼカスケードが活性化し、細胞周期の制御や酸化ストレス応答に関わる遺伝子発現が誘導される。結果として、分裂酵母の細胞周期のG2期からM期への移行が促進され、分裂中の細胞長が通常より顕著に短くなるという表現型が認められる(Aoyama, K. et.al. (2001) Boisci. Biotechnol. Biochem. 65:2347-2352)。

【0012】

(細菌のハイブリッドセンサーキナーゼ)

原核細胞生物である大腸菌(*Escherichia coli*)では、きょう膜多糖の生合成(Capsular polysaccharide synthesis)に関わるcpsオペロンの発現制御にハイブリッドセンサーキナーゼRcsCが関与している。RcsCは細胞膜貫通領域を有するヒスチジンキナーゼであり、フォスフォトランスミッターYojNを介して、レスポンスレギュレーターRcsBにリン酸基転移信号を伝達することが知られている。RcsBのア

アウトプット領域は、cpsオペロンの転写制御活性を有する。具体的には、通常条件では、RcsCのヒスチジンキナーゼ領域のヒスチジン残基が自己リン酸化され、このリン酸基が、同分子内のレシーバー領域のアスパラギン酸残基、YojNのヒスチジン残基、最後にRcsBのレシーバー領域のアスパラギン酸残基に転移する。RcsBのレシーバー領域中のアスパラギン酸残基がリン酸化されることによって、RcsBのアウトプット領域のcpsオペロン転写活性が抑制され、きょう膜多糖の生合成に関わる遺伝子発現が誘導されない状態にある。一方、高浸透圧条件下では、RcsCにおいてヒスチジンキナーゼ領域のヒスチジン残基の自己リン酸化が停止するために、RcsBのアウトプット領域のcpsオペロン転写活性が活性化し、きょう膜多糖の生合成に関わる遺伝子発現が誘導される (Clarke, D. J. et. al. (2002) J. Bacteriol. 184:1204-1208)。

生物発光性の海洋微生物 *Vibrio harveyi* は、自身の細胞密度に応じてルシフェラーゼによる蛍光を発する。この細胞密度応答性の生物発光に関する遺伝子発現制御にハイブリッドセンサーキナーゼLuxN及びLuxQが関与している。LuxN及びLuxQは細胞膜貫通領域を有するヒスチジンキナーゼである。*V. harveyi* は自身の細胞密度を感知するために、Autoinducerと呼ばれる2種類の物質 (AI-1、AI-2) を生産分泌し、AI-1をLuxNが感知し、またAI-2をLuxQが感知することにより情報伝達する。LuxN及びLuxQはフォスフォトランスミッターLuxUを介して、レスポンスレギュレーターLuxOにリン酸基転移信号を伝達することが知られている。LuxOのアウトプット領域は、ルシフェラーゼオペロンの転写制御活性を有する。具体的にLuxNを例にして説明すると、細胞密度が低い場合には、周辺のAI-1が少なくLuxNのインプット領域で感知されないために、LuxNのヒスチジンキナーゼ領域のヒスチジン残基が自己リン酸化され、このリン酸基が、同分子内のレシーバー領域のアスパラギン酸残基、LuxUのヒスチジン残基、最後にLuxOのレシーバー領域のアスパラギン酸残基に転移する。LuxOのレシーバー領域中のアスパラギン酸残基がリン酸化されることによって、LuxOのアウトプット領域のルシフェラーゼオペロン転写活性が抑制され、生物発光に関わる遺伝子発現が誘導されない状態にある。一方、高細胞密度条件下では、AI-1が多く感知されるために、LuxNにおいてヒスチジンキナーゼ領域のヒスチジン残基の自己リン酸化が停止し、LuxOのアウトプ

ット領域のルシフェラーゼオペロン転写活性が活性化して、生物発光が誘導される (Freeman, J.A. et.al. (2000) Mol.Microbiol. 35:139-149)。

【0013】

(植物のハイブリッドセンサーキナーゼ)

高等植物のシロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) では、植物ホルモンであるサイトカイニンの受容体蛋白質 CRE1、AHK2 及び AHK3 がハイブリッドセンサーキナーゼである。受容体蛋白質 CRE1、AHK2 及び AHK3 はいずれも細胞膜貫通領域を有するサイトカイニン感受性のヒスチジンキナーゼである (Inoue, T. et.al. (2001) Nature 409:1060-1063)。CRE1 はフォスフォトランスミッター AHP1 及び AHP2 を介して、レスポンスレギュレーター ARR1、ARR2 及び ARR10 にリン酸基転移信号を伝達することが知られている。ARR1、ARR2 及び ARR10 のアウトプット領域はサイトカイニン誘導性の遺伝子 ARR4~7 の転写制御活性を有すると考えられている。具体的には、サイトカイニン存在下では、CRE1 のヒスチジンキナーゼ領域のヒスチジン残基が自己リン酸化され、このリン酸基が、同分子内のレシーバー領域のアスパラギン酸残基、AHP1 及び AHP2 のヒスチジン残基、最後に ARR1、ARR2 及び ARR10 のレシーバー領域のアスパラギン酸残基に転移する。ARR1、ARR2 及び ARR10 のレシーバー領域中のアスパラギン酸残基がリン酸化されることによって、ARR1、ARR2 及び ARR10 のアウトプット領域の遺伝子転写活性が促進され、サイトカイニン応答性遺伝子 ARR4~7 の発現が誘導される (Hwang, I. & Sheen J. (2001) Nature 413:383-389)。

【0014】

(少なくとも 1 つ以上のハイブリッドセンサーキナーゼを欠損した細胞)

「少なくとも 1 つ以上のハイブリッドセンサーキナーゼを欠損した細胞」として、SLN1 を欠損した出芽酵母、PHK1、PHK2 及び PHK3 の三者をすべて欠損した分裂酵母、RcsC を欠損した大腸菌、LuxN を欠損した *V.harveyi*、CRE1 を欠損したシロイヌナズナ等を挙げることができる。

「少なくとも 1 つ以上のハイブリッドセンサーキナーゼを欠損した細胞」を調製するには、例えば、SLN1 を欠損した出芽酵母 TM182 株は、Maeda, T. et.al. (1994) Nature 369:242-245 記載の方法を用いることができ、PHK1、PHK2 及び PHK3 の三

者をすべて欠損した分裂酵母KI011株は、Aoyama, K. et.al. (2001) Boisci. Biot echnol. Biochem. 65:2347-2352記載の方法を用いることができる。また、RcsCを欠損した大腸菌SRC122株はSuzuki, T., et.al. (2001) Plant Cell Physiol. 42: 107-113に記載の方法で調製でき、LuxNを欠損したV.harveyi BNL63株はFreeman, J.A. et.al. (2000) Mol. Micobiol. 35:139-149記載の方法で調製できる。さらに、CRE1を欠損したシロイヌナズナは、例えば、Inoue, T. et.al. (2001) Nature 409:1060-1063記載の方法に従って、シロイヌナズナを変異原処理して得られたクローンからサイトカニンに対する応答性が喪失したクローンを選抜し、選抜されたクローンのゲノムDNAを鋳型に、Genebank accession AB049934に掲載されているCRE1ゲノム遺伝子の塩基配列を基に合成されたプライマーを用いてPCRでCRE1ゲノム遺伝子断片を増幅し、その塩基配列を確認することによって、CRE1が発現できない欠損クローンを選抜することができる。

また、前記以外の未知のハイブリッドセンサーキナーゼを欠損した細胞を調製するには、例えば、目的とする細胞のハイブリッドセンサーキナーゼ遺伝子を単離し、当該遺伝子を相同組換え等で欠損させることによって調製することもできる。目的とする細胞のハイブリッドセンサーキナーゼ遺伝子を単離するには、ハイブリッドセンサーキナーゼの構造上の特徴を利用することができる。例えば、ヒスチジンキナーゼ領域及びレシーバー領域には、自己リン酸化されうるヒスチジン残基の周辺及び該ヒスチジン残基からリン酸基を受け取るアスパラギン酸残基の周辺のアミノ酸配列が保存されているので、これらの保存領域の塩基配列に基づいて設計されたオリゴヌクレオチドをプライマーとするポリメラーゼチェーン反応（以下、PCRと記す。）や、前記のハイブリッドセンサーキナーゼのアミノ酸配列をコードする塩基配列の部分塩基配列を有するオリゴヌクレオチドをプローブとして用いるハイブリダイゼーション法により、遺伝子を単離することができる。単離された遺伝子の塩基配列より推定されるアミノ酸配列を基に、前記の構造上の特徴を有するかどうかを検証することによって、単離された遺伝子がハイブリッドセンサーキナーゼのアミノ酸配列をコードする塩基配列からなる遺伝子であることを確認することができる。具体的には、Srikantha, T. et.al. (1998) Microbiology 144:2715-2729記載されているPCR法、或いは、Nagahashi, S. e

t.al. (1998) Microbiology 144:425-432、Srikantha,T. et.al. (1998) Microbiology 144:2715-2729記載の方法に従って、SLN1の発現を条件的に抑制した出芽酵母において機能相補性を指標にハイブリッドセンサーキナーゼ遺伝子を単離し、当該遺伝子を欠損した細胞を調製することもできる。PCRやハイブリダイゼーションには、例えば、後述する「細胞膜貫通領域を有さない浸透圧感受性ヒスチジンキナーゼのアミノ酸配列をコードする塩基配列からなる遺伝子」を単離する際に用いる実験条件を用いることもできる。

【0015】

(細胞膜貫通領域を有さない浸透圧感受性のヒスチジンキナーゼ)

次に、前記の「少なくとも1つ以上のハイブリッドセンサーキナーゼを欠損した細胞」に機能可能な形で導入する「細胞膜貫通領域を有さない浸透圧感受性のヒスチジンキナーゼ」について説明する。

糸状菌類において、上記のハイブリッドセンサーキナーゼと類似の構造を有するヒスチジンキナーゼが単離されている。このヒスチジンキナーゼは、ハイブリッドセンサーキナーゼで見られるヒスチジンキナーゼ領域及びレシーバー領域を有するが、インプット領域に、多くのハイブリッドセンサーキナーゼに見られる細胞膜貫通領域を持たないことが特徴であり、この細胞膜貫通領域の代わりに、互いにアミノ酸配列相同性を有する約90アミノ酸からなるポリペプチドが約6回繰返し存在する特徴的な構造を有する蛋白質である。このヒスチジンキナーゼからの信号伝達の様式は完全に解明されていないが、浸透圧応答に関与していることが知られている。

本発明において「相同性」とは、2つの遺伝子又は2つのタンパク質間の配列の同一性をいう。前記「相同性」は、比較対象の配列の領域にわたって、最適な状態にアラインメントされた2つの配列を比較することにより決定される。ここで、比較対象の遺伝子又は蛋白質は、2つの配列の最適なアラインメントにおいて、付加又は欠失（例えばギャップ等）を有していてもよい。尚、相同性は、配列解析ソフト、具体的にはVector NTI、GENETYX-MAC、GENETYX-WINDOWSや公共のデータベースで提供される解析ツールを用いて測定される。前記公共データベースは、例えば、ホームページアドレス<http://www.ddbj.nig.ac.jp>において、一般的

に利用可能である。

ここで、「互いにアミノ酸配列相同性を有する約90アミノ酸からなるポリペプチドが約6回繰返し存在する構造」は、例えば、Alex, L. A. et. al. (1996) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:3416-3421、Ochiai, N. et. al. (2001) Pest Manag. Sci. 57:437-442、Oshima, M. et. al. (2002) Phytopathology 92:75-80等に記載の繰返し配列領域で、ヒスチジinkinナーゼ領域のN末端側に存在する。具体的には、配列番号1で示されるアミノ酸配列で190番目のアミノ酸から707番目のアミノ酸までの領域、配列番号16で示されるアミノ酸配列で189番目のアミノ酸から706番目のアミノ酸までの領域等を挙げることができる。

「細胞膜貫通領域を有さない浸透圧感受性のヒスチジinkinナーゼ」とは、糸状菌類に特徴的に見られるヒスチジinkinナーゼであり、互いにアミノ酸配列相同性を有する約90アミノ酸からなるポリペプチドの繰返し配列領域、ヒスチジinkinナーゼ領域及びレシーバー領域を有し、且つ細胞膜貫通領域を持たない構造上の特徴を有し、浸透圧感受性を有する蛋白質を言う。

浸透圧感受性を有することを確認するには、当該ヒスチジinkinナーゼを欠損させることによって、浸透圧ストレスに対する感受性が増強することを確認してもよいし、当該ヒスチジinkinナーゼを前記の浸透圧感受性のハイブリッドセンサーキナーゼSLN1を欠損した出芽酵母に導入することによって、機能的に生育相補することを確認することによって、浸透圧感受性であることを確認することもできる。

糸状菌類の中でも、主に、糸状菌のモデル生物であるアカパンカビ、植物を宿主とした病原微生物である植物病原糸状菌、又はヒト等に感染性のある病原糸状菌等で「細胞膜貫通領域を有さない浸透圧感受性のヒスチジinkinナーゼ」の存在が報告されている。以下に、具体的な「細胞膜貫通領域を有さない浸透圧感受性のヒスチジinkinナーゼ」の例を挙げて説明する。

【0016】

(アカパンカビの細胞膜貫通領域を有さない浸透圧感受性のヒスチジinkinナーゼ)

アカパンカビの浸透圧感受性の変異株os-1より単離されたOS-1遺伝子にコードさ

れる蛋白質OS-1を、「細胞膜貫通領域を有さない浸透圧感受性のヒスチジンキナーゼ」として挙げるができる(Schumacher, M.M. et.al. (1997) Current Microbiol. 34:340-347, Alex, L.A. et.al. (1996) Proc.Natl.Acad.Sci.USA 93:3416-3421)。OS-1のアミノ酸配列、及び、OS-1遺伝子の塩基配列が公開されており(アミノ酸配列: AAB03698, AAB01979、塩基配列: U50263, U53189)、抗菌活性物質のスクリーニングへの有用性がUS5,939,306に記載されている。アカパンカビ変異株os-1は、野生株より高浸透圧ストレスに感受性が高くなることから、OS-1はアカパンカビにおいて浸透圧適応に關与する浸透圧感受性ヒスチジンキナーゼであることが分かっている。OS-1はそのアミノ酸配列から、前記の構造的な特徴を有することが知られている。また、アカパンカビ変異株os-1は、ジカルボキシイミド系抗菌活性物質、芳香族炭化水素系抗菌活性物質又はフェニルピロール系抗菌活性物質等を有効成分として含有する殺菌剤に抵抗性を有することも知られている。さらに、ジカルボキシイミド系抗菌活性物質を有効成分として含有する殺菌剤に抵抗性を示すアカパンカビ変異株より単離されたOS-1変異遺伝子は、OS-1の特徴的な繰返し配列中にアミノ酸置換をもたらすような遺伝子変異が、OS-1遺伝子上に認められた(Miller, T.K. et.al. (2002) Fungl Gen.Biol. 35:147-155)。このようなことから、前記の殺菌剤の有効成分として含まれる抗菌活性物質がアカパンカビのOS-1を標的としていることが予想されている。

【0017】

(灰色カビ病糸状菌の細胞膜貫通領域を有さない浸透圧感受性のヒスチジンキナーゼ)

次に、「細胞膜貫通領域を有さない浸透圧感受性のヒスチジンキナーゼ」の具体的な例として、灰色カビ病糸状菌(*Botryotinia fuckeliana*)のBcOS-1が挙げられる。BcOS-1遺伝子は、アカパンカビOS-1遺伝子の相同遺伝子として単離され、塩基配列及びアミノ酸配列が公開されている(塩基配列: Genbank accession AF396287, AF435964, アミノ酸配列: Genbank accession AAL37947, AAL30826)。BcOS-1はそのアミノ酸配列から、前記の構造的な特徴を有することが知られている。また、灰色カビ病糸状菌のジカルボキシイミド系抗菌活性物質を有効成分として含有する殺菌剤に対する抵抗性株から単離されたBcOS-1遺伝子には、アカパン

カビのジカルボキシイミド系抗菌活性物質を有効成分として含有する殺菌剤に対する抵抗性株から単離されたOS-1遺伝子の場合と同様に、BcOS-1の特徴的な繰返し配列中にアミノ酸置換をもたらすような遺伝子変異が、BcOS-1遺伝子上に認められた。さらに、このBcOS-1を欠損した抗菌活性物質耐性変異株は、野生株より浸透圧感受性が高いことから、BcOS-1が浸透圧感受性のヒスチジンキナーゼであることが知られている(Oshima, M. et.al. (2002) *Phytopathology* 92:75-80)。BcOS-1として、より具体的には、実施例に記載したBc-16株より単離された配列番号1で示されるアミノ酸配列を有するBcOS-1を挙げることができる。

【0018】

(イネいもち病糸状菌の細胞膜貫通領域を有さない浸透圧感受性のヒスチジンキナーゼ)

さらに、「細胞膜貫通領域を有さない浸透圧感受性のヒスチジンキナーゼ」の具体的な例として、イネいもち病糸状菌(*Magnaporthe grisea*)のHIK1を挙げることができる。HIK1遺伝子は、アカパンカビOS-1遺伝子の相同遺伝子として塩基配列及びアミノ酸配列が公開されている(塩基配列: Genbank accession AB041647, アミノ酸配列: Genbank accession BAB40947)。HIK1はそのアミノ酸配列から、上記のような細胞膜貫通領域を持たない等の構造的な特徴を有することが知られている。また、HIK1遺伝子を欠損したイネいもち病糸状菌は野生株より高い浸透圧感受性が認められ、HIK1が浸透圧感受性のヒスチジンキナーゼであることが示されている。(hppt://www.sci.saitama-u.ac.jp/seitai/iden/Japanese/Abst Symp3.html)

HIK1として、より具体的には、実施例に記載したP-37株より単離された配列番号16で示されるアミノ酸配列を有するHIK1を挙げることができる。

【0019】

前記の糸状菌類以外の真核細胞生物(例えば、酵母等)においても、OS-1遺伝子の相同遺伝子として、*Candida albicans*のCaNIK1(COS1)遺伝子が単離され、塩基配列及びアミノ酸配列が公開されている(塩基配列: Genbank accession AB006363, AB029029, U69886 アミノ酸配列: Genbank accession BAA24952, AAC72284, AAC23929)。CaNIK1もそのアミノ酸配列から、前記の構造的な特徴を有するこ

とが知られている。CaNIKは出芽酵母の浸透圧感受性ハイブリッドセンサーキナーゼSLN1を機能相補することから浸透圧感受性のヒスチジンキナーゼであることが推測される(Nagahashi, S. et.al. (1998) Microbiology 144:245-432, Srikantha, T. et.al. (1998) Microbiology 144:2715-2729)。

(糸状菌及び酵母の定義)

なお、本発明において「糸状菌」とは「改訂版微生物の分類と同定(上)、長谷川武治編、学会出版センター、1984年(ISBN 4-7622-7399-6)」等に記載されている、変形菌門(Myxomycota)と真正菌門(Eumycota)からなる菌類(fungi)、のうち、酵母(yeast)として分類され得る菌類以外の菌類」を意味する。例えば、変形菌門に分類される糸状菌としては、ネコブカビ綱に属するハクサイ根こぶ病糸状菌(*Plasmodiophora brassicae*)等があげられる。また真正菌門に分類される糸状菌としては、鞭毛菌亜門に属するジャガイモ疫病糸状菌(*Phytophthora infestans*)、接合菌亜門に属するサツマイモ軟腐病糸状菌(*Rhizopus stolonifer*)、立枯病糸状菌(*Rhizopus oryzae*)、子のう菌亜門に属するアカパンカビ(*Neurospora crassa*)、コムギ葉枯病糸状菌(*Mycosphaella tritici*)、コムギうどんこ病糸状菌(*Erysiphe graminis*)、イネ立枯病糸状菌(*Linocarpus cariceti*)、ごま葉枯病糸状菌(*Cochliobolus miyabeanus*)、灰色カビ病糸状菌(*Botrytis fuckeliana*)、イネいもち病糸状菌(*Magnaporthe grisea*)、担子菌亜門に属するトウモロコシ黒穂病糸状菌(*Ustilago maydis*)、コムギさび病糸状菌(*Puccinia recondita*)、イネ紋枯病糸状菌(*Thanatephorus cucumeris*)、不完全菌亜門に属するトマト葉かび病糸状菌(*Cladosporium fulvum*)、ナシ黒斑病糸状菌(*Alternaria kikuchiana*)、ハウレンソウ萎凋病糸状菌(*Fusarium oxysporum*)等があげられる。

また、酵母(yeast)とは、「改訂版微生物の分類と同定(上)、長谷川武治編、学会出版センター、1984年(ISBN 4-7622-7399-6)」に記載されているように、「主として出芽によって増殖し、単細胞世代が長く、単細胞の増殖で形成するコロニーは毛状にならず、白色ないし明色の糊状となる」ような菌類を意味する。例えば、*Saccharomyces*属に属する*Saccharomyces cerevisiae*、*Schizosaccharomyces*属に属する*Schizosaccharomyces pombe*、*Phichia*属に属する*Phichia burt*

onii、Candida属に属するCandida albicans等をあげることができる。

【0020】

(ジカルボキシイミド系抗菌活性物質、芳香族炭化水素系抗菌活性物質又はフェニルピロール系抗菌活性物質のいずれかに対する抵抗性変異を有するヒスチジinkinaseであり、かつ細胞膜貫通領域を有さない浸透圧感受性であるヒスチジinkinase)

前記の「細胞膜貫通領域を有さない浸透圧感受性ヒスチジinkinase」は、ジカルボキシイミド系抗菌活性物質、芳香族炭化水素系抗菌活性物質又はフェニルピロール系抗菌活性物質のいずれかに対する抵抗性変異を有する。

ここで、ジカルボキシイミド系抗菌活性物質とは、ジカルボキシイミドを基本骨格とする抗菌活性物質の総称であり、Modern Selective Fungicide Properties, Applications, Mechanisms of Action- 2nd revised and enlarged edition Lyr, H. ed. Gustav Fischer Verlag, New York, USA ISBN 3-334-60455-1 Chapter 6, p99-118等に記載されている抗菌活性物質を示す。具体的には、化学式(1)に示される構造を有する化合物(Procymidone: 以下、化合物(1)と記すこともある。)、化学式(2)に示される構造を有する化合物(Iprodione: 以下、化合物(2)と記すこともある。)、化学式(3)に示される構造を有する化合物(Vinclozolin: 以下、化合物(3)と記すこともある。)等を挙げることができる。芳香族炭化水素系抗菌活性物質とは、ベンゼン環を基本骨格とする抗菌活性物質の総称であり、Modern Selective Fungicide Properties, Applications, Mechanisms of Action- 2nd revised and enlarged edition Lyr, H. ed. Gustav Fischer Verlag, New York, USA ISBN 3-334-60455-1 Chapter 5, p75-98等に記載されている抗菌活性物質を示す。具体的には、化学式(4)に示される構造を有する化合物(Quintozene: 以下、化合物(4)と記すこともある。)、化学式(5)に示される構造を有する化合物(Tolclofos-methyl: 以下、化合物(5)と記すこともある。)等を挙げることができる。また、フェニルピロール系抗菌活性物質とは、フェニルピロールを基本骨格とする抗菌活性物質の総称であり、Modern Selective Fungicide Properties, Applications, Mechanisms of Action- 2nd revised and enlarged edition Lyr, H. ed. Gustav Fischer Verlag, New York, USA ISBN 3-33

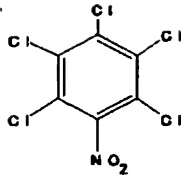
4-60455-1 Capter 19, p405-407等に記載されている抗菌活性物質を示す。具体的には、化学式(6)に示される構造を有する化合物(Fludioxonil: 以下、化合物(6)と記すこともある。)、化学式(7)に示される構造を有する化合物(Fenpiclonil: 以下、化合物(7)と記すこともある。)等を挙げることができる。

【0021】

前記ジカルボキシイミド系抗菌活性物質、芳香族炭化水素抗菌活性物質、フェニルピロール系抗菌活性物質の代表的な化合物の化学式を以下に示す。

【化4】

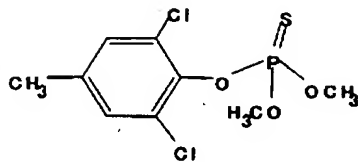
化学式(4)



(5) 化学式(5)に示される構造を有する化合物(化合物(5))

【化5】

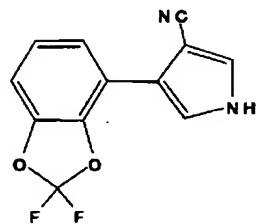
化学式(5)



(6) 化学式(6)に示される構造を有する化合物(化合物(6))

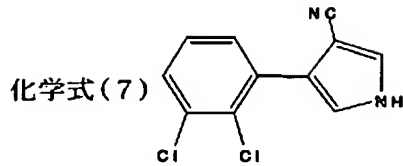
【化6】

化学式(6)



(7) 化学式(7)に示される構造を有する化合物(化合物(7))

【化7】



【0022】

「ジカルボキシイミド系抗菌活性物質、芳香族炭化水素系抗菌活性物質又はフェニルピロール系抗菌活性物質のいずれかに対する抵抗性変異」とは、ジカルボキシイミド系抗菌活性物質、芳香族炭化水素系抗菌活性物質又はフェニルピロール系抗菌活性物質のいずれかに対する抵抗性を有する糸状菌類の変異株における「細胞膜貫通領域を有さない浸透圧感受性ヒスチジinkinナーゼ」で見出されうる変異であって、ジカルボキシイミド系抗菌活性物質、芳香族炭化水素系抗菌活性物質又はフェニルピロール系抗菌活性物質に対する抵抗性に関与するアミノ酸置換、付加又は欠失変異を示す。但し、当該変異によって「細胞膜貫通領域を有さない浸透圧感受性ヒスチジinkinナーゼ」がヒスチジinkinナーゼとして機能しなくなる変異は除外する。ここで、ジカルボキシイミド系抗菌活性物質、芳香族炭化水素系抗菌活性物質又はフェニルピロール系抗菌活性物質のいずれかに対する抵抗性を有する糸状菌類の変異株は、ジカルボキシイミド系抗菌活性物質、芳香族炭化水素系抗菌活性物質又はフェニルピロール系抗菌活性物質を施用された自然界より単離しうる糸状菌類であっても、糸状菌類を人為的にジカルボキシイミド系抗菌活性物質、芳香族炭化水素系抗菌活性物質又はフェニルピロール系抗菌活性物質で処理することにより突然変異で抵抗性を獲得した糸状菌類でもよい。

具体的には、灰色カビ病糸状菌の「細胞膜貫通領域を有さない浸透圧感受性ヒスチジinkinナーゼ」であるBcOS-1において、ジカルボキシイミド系抗菌活性物質に対する抵抗性に関与するアミノ酸置換I365Sが、Oshima, M. et.al. (2002) *Phytopathology* 92:75-80に報告されている。ここで、「I365S」は365番目のイソロイシンがセリンに置換されていることを意味する。以下、同様にアミノ酸置換

を記載する。アカパンカビの「細胞膜貫通領域を有さない浸透圧感受性ヒスチジンキナーゼ」であるOS-1遺伝子におけるジカルボキシイミド系抗菌活性物質に対する抵抗性に関与するアミノ酸置換として、T368P、Q388S、E418E、L459M、A578V、G580R、I582M、M639V、A578V、G580G、L625Pが、アミノ酸欠失として680Kが、Miller, T.K. et.al. (2002) Fungal Gen.Biol. 35:147-155で報告されている。ここで、680Kは680番目のリジンが欠失されていることを意味する。以下、同様にアミノ酸欠失を記載する。また、アカパンカビのOS-1遺伝子におけるフェニルピロール系抗菌活性物質に対する抵抗性に関与するアミノ酸置換として、A578V、G580R、L625Pが、Ochiai, N. et.al. (2001) Pest Management Sci. 57:437-442で報告されている。

より具体的には、実施例に記載した配列番号13で示されるアミノ酸配列を有するBcOS-1を挙げることができる。

上記の抵抗性変異以外にも、ジカルボキシイミド系抗菌活性物質、芳香族炭化水素系抗菌活性物質又はフェニルピロール系抗菌活性物質のいずれかに対する抵抗性を有する糸状菌類の変異株から単離された「細胞膜貫通領域を有さない浸透圧感受性ヒスチジンキナーゼ」のアミノ酸配列を解析し、感受性の野生株における当該蛋白質のアミノ酸配列と比較することによって、抵抗性変異を見出してもよい。

【0023】

(少なくとも1つ以上のハイブリッドセンサーキナーゼを欠損した細胞に、細胞膜貫通領域を有さない浸透圧感受性ヒスチジンキナーゼのアミノ酸配列をコードする塩基配列からなる遺伝子が機能可能な形で導入されてなる形質転換細胞の作製)

細胞膜貫通領域を有さない浸透圧感受性ヒスチジンキナーゼ（以下、本発明ヒスチジンキナーゼと記すこともある。）のアミノ酸配列をコードする塩基配列からなる遺伝子が機能可能な形で導入されてなる形質転換細胞は、「本発明ヒスチジンキナーゼのアミノ酸配列をコードする塩基配列からなる遺伝子」等を、以下のようにして宿主細胞となる「少なくとも1つ以上のハイブリッドセンサーキナーゼを欠損した細胞」に導入することにより得ることができる。以下、当該形質転

換細胞の作製方法についてその一例を示す。

【 0 0 2 4 】

(1) cDNAの調製

まず、例えば、J., Sambrook, E., F., Frisch, T., Maniatis 著、モレキュラークローニング第 2 版 (Molecular Cloning 2nd edition) 記載の方法に準じて、糸状菌類から全 RNA を調製する。具体的には、例えば、アカパンカビ (*Neurospora crassa*)、灰色カビ病糸状菌 (*Botrytinia fuckeliana*)、イネいもち病糸状菌 (*Magnaporthe grisea*)、ジャガイモ疫病糸状菌 (*Phytophthora infestans*)、イネ紋枯病糸状菌 (*Thanatephorus cucumeris*)、ホウレンソウ萎凋病糸状菌 (*Fusarium oxysporum*)、コムギ葉枯病糸状菌 (*Mycosphaella tritici*) 等からその組織の一部を採取した後、当該組織を液体窒素中で凍結させ、乳鉢等により物理的に磨砕し、(a) 得られた磨砕物に、塩酸グアニジンとフェノールとを含む溶液又は SDS とフェノールとを含む溶液を添加して全 RNA を得る方法、(b) 前述の磨砕物にグアニジンチオシアネートを含む溶液を添加して、さらに CsCl を加え遠心分離することにより全 RNA を得る方法等を用いればよい。当該操作には、例えば、RNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN 社製) 等の市販のキットを用いることもできる。

【 0 0 2 5 】

次いで、このようにして調製された全 RNA を用いて cDNA を作製する。例えば、オリゴ dT 鎖又はランダムプライマーを全 RNA にアニールさせた後に、逆転写酵素を作用させることにより cDNA を作製すればよい。またさらに、当該 cDNA に、例えば、RNaseH、DNA Polymerase I を作用させることにより、2 本鎖 cDNA を作製することができる。当該操作には、SMART™ PCR cDNA Synthesis Kit (クロンテック社製)、cDNA Synthesis Kit (宝酒造社製)、cDNA Synthesis Kit (アマシャムファルマシア社製) 及び ZAP- cDNA Synthesis Kit (Stratagene 社製) 等の市販のキットを用いることができる。

【 0 0 2 6 】

(2) クローニング

公知の遺伝子の場合には、このように調製された cDNA から、例えば、公開さ

れている塩基配列の部分塩基配列を有するオリゴヌクレオチドをプライマーとして用いるPCRや、公開されている塩基配列の部分塩基配列を有するオリゴヌクレオチドをプローブとして用いるハイブリダイゼーション法により、本発明ヒスチジンキナーゼのアミノ酸配列をコードする塩基配列からなる遺伝子を取得することができる。

具体的には、灰色カビ病糸状菌 cDNA から配列番号 2 で示される塩基配列の部分塩基配列を有するオリゴヌクレオチドをプライマーとして用いる PCR や、配列番号 2 で示される塩基配列の部分塩基配列を有するオリゴヌクレオチドをプローブとして用いるハイブリダイゼーション法により、本発明ヒスチジンキナーゼである BcOS-1 のアミノ酸配列をコードする塩基配列からなる遺伝子を取得することができる。

また、具体的には、イネいもち病糸状菌 cDNA から配列番号 17 で示される塩基配列の部分塩基配列を有するオリゴヌクレオチドをプライマーとして用いる PCR や、配列番号 17 で示される塩基配列の部分塩基配列を有するオリゴヌクレオチドをプローブとして用いるハイブリダイゼーション法により、本発明ヒスチジンキナーゼである HIK1 のアミノ酸配列をコードする塩基配列からなる遺伝子を取得することができる。

未知の遺伝子の場合には、塩基配列が公知である本発明ヒスチジンキナーゼの塩基配列の部分塩基配列を有するオリゴヌクレオチドをプローブとして用いるハイブリダイゼーション法、又は、塩基配列が公知である複数の本発明ヒスチジンキナーゼにおける塩基配列の相同性に基づいて設計されたオリゴヌクレオチドをプライマーとして用いた PCR によって取得することができる。塩基配列が公知である複数の本発明ヒスチジンキナーゼにおける塩基配列の相同性とは、例えば、本発明ヒスチジンキナーゼの構造上の特徴である「約 90 アミノ酸からなるポリペプチドの繰返し配列領域」、「ヒスチジンキナーゼ領域」、「レシーバー領域」等に見られる塩基配列の相同性を挙げることができる。

【0027】

より具体的には、灰色カビ病糸状菌の BcOS-1 を PCR で取得する場合には、約 20bp から約 40bp 程度の塩基配列、例えば、配列番号 2 で示される塩基配列の 5' 非翻

訳領域及び3' 非翻訳領域からそれぞれ選択した塩基配列に基いて設計、合成されたオリゴヌクレオチドをプライマーセットとして用いることができる。当該プライマーセットとしては、例えば、配列番号3で示される塩基配列からなるオリゴヌクレオチドと配列番号4で示される塩基配列からなるオリゴヌクレオチドとのセットをプライマーセットとして挙げるることができる。用いられるPCR反応液は、cDNA250ngにキット指定の反応液を添加することにより調製すればよい。PCR反応条件としては、使用するプライマーセットによって適宜変更することができるが、例えば、94℃で2分間保温し、次に約8℃で3分間保温した後、94℃で30秒間、55℃で30秒間、72℃で4分間のサイクルを40サイクル程度繰り返す条件や、94℃で5秒間次いで72℃で4分間の保温を1サイクルとしてこれを5から10サイクル行い、さらに、94℃で5秒間保温し、次いで70℃で4分間保温するサイクルを1サイクルとしてこれを20から40サイクル程度繰り返す条件をあげることができる。当該操作には、例えば、Takara HeraculaseTM (宝酒造社製)、Advantage cDNA PCR Kit (クロンテック社製) に含まれるDNAポリメラーゼ、TAKARA Ex Taq (宝酒造社製)、PLATINUMTM PCR SUPER Mix (ライフテックオリエンタル社製)、KOD-Plus- (東洋紡製) 等の市販のキットを用いることができる。

また、イネいもち病糸状菌のHIK1をPCRで取得する場合には、例えば、配列番号17で示される塩基配列の5' 非翻訳領域及び3' 非翻訳領域からそれぞれ選択された塩基配列に基いて設計、合成されたオリゴヌクレオチドをプライマーセットとして用いることができる。当該プライマーセットとしては、例えば、配列番号18で示される塩基配列からなるオリゴヌクレオチドと配列番号19で示される塩基配列からなるオリゴヌクレオチドとのセットをプライマーセットとして挙げるることができる。用いられるPCR反応液、反応条件は、前記と同様に実施することによって、HIK1遺伝子を取得することができる。

【0028】

ハイブリダイゼーション法を用いる場合には、例えばJ., Sambrook, E., F., Fritsch, T., Maniatis著、モレキュラークローニング第2版 (Molecular Cloning 2nd edition) 記載の方法に準じてクローニングを行うことができる。

灰色カビ病糸状菌のBcOS-1、或いは、未知の本発明ヒスチジンキナーゼの遺伝子

を取得する場合に用いられるプローブは、配列番号2で示される塩基配列の部分塩基配列を有するDNA（約200塩基～約500塩基程度の鎖長）を合成し、当該DNAを、例えば、Random Primed DNA Labelling Kit（ベーリンガー社製）、Random Primer DNA Labelling Kit Ver.2（宝酒造社製）、ECL Direct Nucleic Acid Labelling and Detection System（アマシャムファルマシア社製）、Megaprime DNA-labelling system（アマシャムファルマシア社製）等を用いた公知の方法に準じてラジオアイソトープ標識又は蛍光標識することにより得ることができる。

ハイブリダイゼーション条件としては、例えば、ストリンジェントな条件をあげることができ、具体的には、例えば、6×SSC（0.9M NaCl、0.09Mクエン酸三ナトリウム）、5×デンハルト溶液（0.1%(w/v) フィコール400、0.1%(w/v) ポリビニルピロリドン、0.1%BSA）、0.5%(w/v) SDS及び100 µg/ml変性サケ精子DNA存在下に、又は100 µg/ml変性サケ精子DNAを含むDIG EASY Hyb溶液（ベーリンガーマンハイム社）中で、65℃で保温し、次いで1×SSC（0.15M NaCl、0.015Mクエン酸三ナトリウム）及び0.5%SDS存在下に、室温で15分間の保温を2回行い、さらに0.1×SSC（0.015M NaCl、0.0015Mクエン酸三ナトリウム）及び0.5%SDS存在下に、68℃で30分間保温する条件をあげることができる。

灰色カビ病糸状菌Bc0S-1遺伝子を得るためには、例えば、灰色カビ病糸状菌cDNAライブラリーファージ液（約1,000,000pfu）を鋳型にして、TAKARA LA taqTM（宝酒造社製）を用いて、配列番号9に示される塩基配列からなるオリゴヌクレオチドと配列番号10に示される塩基配列の相補鎖に相当する塩基配列からなるオリゴヌクレオチドとをプライマーセットとしてPCRを行うことによりプローブとするDNAを増幅し、これを取得すればよい。用いられるPCR反応液は、DNAライブラリー250ngにキット指定の反応液を添加することにより調製すればよい。

PCR反応条件としては、例えば、94℃で2分間保温し、次に8℃で3分間保温した後、94℃で30秒間、55℃で30秒間、68℃で5分間のサイクルを40サイクル繰り返すことにより増幅を行う条件をあげることができる。

次に、増幅・取得されたDNAを鋳型にして、Megaprime DNA-labelling system（アマシャムファルマシア社製）を用いて、当該キット指定の反応液を用いること

により³²Pでラベルされたプローブを作製することができる。このようにして作製されたプローブを用いて通常の方法に従ってコロニーハイブリダイゼーションを行い、6×SSC (0.9M NaCl、0.09Mクエン酸三ナトリウム)、5×デンハルト溶液 (0.1%(w/v) フィコール400、0.1%(w/v) ポリビニルピロリドン、0.1%BSA)、0.5%(w/v) SDS及び100 µg/ml変性サケ精子DNA存在下に、又は100 µg/ml変性サケ精子DNAを含むDIG EASY Hyb溶液 (ベーリンガー・マンハイム社) 中で、65℃で保温し、次いで1×SSC (0.15M NaCl、0.015Mクエン酸三ナトリウム) 及び0.5%SDS存在下に、室温で15分間の保温を2回行い、さらに0.1×SSC (0.015M NaCl、0.0015Mクエン酸ナトリウム) 及び0.5%SDS存在下に、68℃で30分間保温することにより当該プローブにハイブリダイズするクローンを得ることができる。

【0029】

また、塩基配列が公知の本発明ヒスチジンキナーゼの遺伝子は、例えば、公開されている塩基配列に基づいて、例えば、ホスファイト・トリエステル法 (Hunkapiller, M. et al., Nature, 310, 105, 1984) 等の通常の方法に準じて、核酸の化学合成を行うことにより調製することもできる。

【0030】

上記のようにして得られた本発明ヒスチジンキナーゼのアミノ酸配列をコードする塩基配列からなる遺伝子は、「Molecular Cloning: A Laboratory Manual 2nd edition」(1989), Cold Spring Harbor Laboratory Press、「Current Protocols In Molecular Biology」(1987), John Wiley & Sons, Inc. ISBN0-471-50338-X等に記載される通常の方法に準じてベクターにクローニングすればよい。用いられるベクターとしては、例えば、pBlueScriptIIベクター (Stratagene社製)、pUC18/19ベクター (宝酒造社製)、TAクローニングベクター (Invitrogen社製)等をあげることができる。

尚、クローニングされた遺伝子の塩基配列は、Maxam Gilbert法 (例えば、Maxam, A.M & W. Gilbert, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74, 560, 1977 等に記載される) やSanger法 (例えばSanger, F. & A.R. Coulson, J. Mol. Biol., 94, 441, 1975, Sanger, F. & Nicklen and A.R. Coulson., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74, 5463, 1977等に記載される) 等により確認すればよい。当該操作には、例えば、Termo S

eqenase II dye terminator cycle sequencing kit (アマシャムファルマシア社製)、Dye Terminator Cycle Sequencing FS Ready Reaction Kit (PEバイオシステムズジャパン社製) 等の市販キットを用いることができる。

【0031】

(3) 発現ベクターの構築

本発明ヒスチジンキナーゼのアミノ酸配列をコードする塩基配列からなる遺伝子の発現ベクターの構築は、通常の方法（例えば、J., Sambrook, E., F., Frisch, T., Maniatis 著、モレキュラークローニング第2版 (Molecular Cloning 2nd edition)、コールド スプリング ハーバー ラボラトリー発行 (Cold Spring Harbor Laboratory press) 等に記載されている方法) に準じて行えばよい。

例えば、形質転換する宿主細胞において利用可能なベクター、例えば、宿主細胞中で複製可能な遺伝情報を含み、自立的に増殖できるベクターであって、さらに、宿主細胞からの単離・精製が可能であり、検出可能なマーカーを持っていたもよいベクター（具体的には、大腸菌等の細菌を宿主細胞とする場合には、例えば、プラスミド pUC119 (宝酒造 (株) 製) やファージミド pBluescript II (ストラタジーン社製) 等を使用すればよい。酵母を宿主細胞とする場合には、例えば、プラスミド pACT2 (Clontech 社製)、p415CYC (ATCC87382)、p415ADH (ATCC87374) 等を使用すればよい。植物細胞を宿主細胞とする場合には、例えば、プラスミド pBI221 (Clontech 社) 等を使用すればよい。) に、本発明ヒスチジンキナーゼのアミノ酸配列をコードする塩基配列からなる遺伝子を組み込むことにより構築すればよい。

【0032】

本発明ヒスチジンキナーゼのアミノ酸配列をコードする塩基配列からなる遺伝子上流に、宿主細胞で機能可能なプロモーターを機能可能な形で結合する形で前記ベクターに組み込むことにより、本発明ヒスチジンキナーゼのアミノ酸配列をコードする塩基配列からなる遺伝子を宿主細胞で発現させることが可能となる発現ベクターを構築することができる。ここで、「機能可能な形で結合させる」とは、宿主細胞においてプロモーターの制御下に本発明ヒスチジンキナーゼのアミノ酸配列をコードする塩基配列からなる遺伝子が発現するように、当該プロモ-

ターと本発明ヒスチジinkinナーゼのアミノ酸配列をコードする塩基配列からなる遺伝子とを結合させることを意味する。宿主細胞で機能可能なプロモーターとしては、例えば、宿主細胞が大腸菌である場合には、大腸菌のラクトースオペロンのプロモーター (lacP)、トリプトファンオペロンのプロモーター (trpP)、アルギニンオペロンのプロモーター (argP)、ガラクトースオペロンのプロモーター (galP)、tacプロモーター、T7プロモーター、T3プロモーター、 λ ファージのプロモーター (λ -pL、 λ -pR)等をあげることができる。また、宿主細胞が酵母である場合には、ADH1プロモーターやCYC1プロモーター (尚、ADH1プロモーターは、例えばADH1プロモーター及びCYC1ターミネーターを保持する酵母発現ベクターp415ADH(ATCC87374)から通常の遺伝子工学的的方法により調製することができる。CYC1プロモーターは、p415CYC(ATCC87382)から通常の遺伝子工学的的方法により調製することができる。)等をあげることができる。宿主細胞が植物細胞である場合には、例えば、ノパリン合成酵素遺伝子 (NOS) プロモーター、オクトピン合成酵素遺伝子 (OCT) プロモーター、カリフラワーモザイクウイルス (CaMV)由来19Sプロモーター、CaMV由来35Sプロモーター等をあげることができる。

【0033】

また、本発明ヒスチジinkinナーゼのアミノ酸配列をコードする塩基配列からなる遺伝子を、宿主細胞において機能可能なプロモーターをあらかじめ保有するベクターに組み込む場合には、当該ベクターが保有するプロモーターと本発明ヒスチジinkinナーゼの遺伝子とが機能可能な形で結合するように、当該プロモーターの下流に本発明ヒスチジinkinナーゼの遺伝子を挿入すればよい。例えば、前述の酵母用プラスミドp415ADHはADH1プロモーターを有しており、当該プラスミドのADH1プロモーターの下流に本発明ヒスチジinkinナーゼの遺伝子を挿入すれば、本発明ヒスチジinkinナーゼの遺伝子を、例えば、*Saccharomyces cerevisiae* AH22(IF 010144)やTM182(Maeda, T. et. al. (1994) Nature 369:242-245)等の出芽酵母内で発現させることが可能となる発現ベクターを構築することができる。

【0034】

(4) 形質転換細胞の作製

構築された発現ベクターを宿主細胞に通常の方法として導入することにより、本

発明において用いられる形質転換細胞を作製することができる。形質転換細胞を作製するために用いられる宿主細胞としては、例えば、細菌、酵母、植物細胞等を挙げることができる。細菌としては、例えば、大腸菌、*Vibrio harveyi*等を挙げることができる。酵母としては、出芽酵母、分裂酵母を挙げることができ、さらに具体的には、例えば、サッカロマイセス属、スキゾサッカロマイセス属等に属する酵母を挙げることができる。植物細胞としては、例えば、シロイヌナズナ等の植物細胞を挙げることができる。

発現ベクターを上記の宿主細胞に導入する方法としては、形質転換される宿主細胞に応じた通常の導入方法を適用することができる。例えば、宿主細胞として細菌を用いる場合には、「モレキュラー・クローニング」(J. Sambrookら、コールド・スプリング・ハーバー、1989年)等に記載される塩化カルシウム法やエレクトロポレーション法等の通常の導入方法を用いることにより前記発現ベクターを宿主細胞に導入することができる。宿主細胞として酵母を用いる場合には、例えば、リチウム法を基にしたYeast transformation kit(Clontech社製)等を用いることにより前記発現ベクターを宿主細胞に導入することができる。また、宿主細胞として植物細胞を用いる場合には、例えば、アグロバクテリウム感染方法(特公平2-58917及び特開昭60-70080)、プロトプラストへのエレクトロポレーション方法(特開昭60-251887及び特開平5-68575)及びパーティクルガン方法(特表平5-508316及び特開昭63-258525)等の通常の導入方法を用いることにより前記発現ベクターを宿主細胞に導入することができる。

【0035】

(本発明ヒスチジinkinナーゼに関わる細胞内信号伝達系)

本発明において、前述のようにして作製された形質転換細胞内で発現された本発明ヒスチジinkinナーゼからの細胞内信号伝達量又はそれに相関関係を有する指標値を測定するには、形質転換細胞を作製するために使用される宿主細胞が本来有している細胞内信号伝達系を利用すればよい。利用可能な細胞内信号伝達系としては、例えば、前記の出芽酵母の浸透圧制御の細胞内信号伝達、分裂酵母の細胞周期や酸化ストレス応答の細胞内信号伝達、大腸菌のきょう膜多糖類生合成オペロンの発現制御に関わる細胞内信号伝達、生物発光性の海洋微生物*Vibrio harve*

yiの細胞密度感受性の発光制御に関わる細胞内信号伝達、シロイヌナズナのサイトカニン応答に関わる細胞内信号伝達等を挙げることができる。

【0036】

また、このような形質転換細胞を作製するために使用される宿主細胞として、「少なくとも1つ以上のハイブリッドセンサーキナーゼを欠損した細胞」を使用する。即ち、前記宿主細胞において、宿主細胞固有の少なくとも一つ以上のハイブリッドセンサーキナーゼを欠損していることにより、導入された本発明ヒスチジンキナーゼが、欠損されたハイブリッドセンサーキナーゼの代わりに機能して細胞内信号伝達を行うことができ、例えば、被験物質を当該形質転換細胞に与えた場合には、生育量の変化、形態の変化、形状の変化、細胞内での特定物質の生合成量の変化、特定物質の代謝量の変化等が起こることがある。このような場合、本発明ヒスチジンキナーゼに作用する被験物質の抗菌活性を、当該形質転換細胞の生育量の変化、形態の変化、形状の変化、細胞内での特定物質の生合成量の変化、特定物質の代謝量の変化等で測定することができる。

一方、形質転換細胞を作製するために使用される宿主細胞において、宿主細胞固有の少なくとも一つ以上のハイブリッドセンサーキナーゼが欠損されていない場合、当該形質転換細胞の細胞内信号伝達には、宿主細胞固有のハイブリッドセンサーキナーゼからの信号伝達と導入された本発明ヒスチジンキナーゼからの細胞内信号伝達とが混在する。当該形質転換細胞では、導入された本発明ヒスチジンキナーゼからの細胞内信号伝達量を反映する当該形質転換細胞の生育量の変化、形態の変化、形状の変化、細胞内での特定物質の生合成量の変化、特定物質の代謝量の変化等は、宿主細胞固有のハイブリッドセンサーキナーゼからの細胞内信号伝達量に影響を受け小さくなる。本発明で、宿主細胞固有の少なくとも一つ以上のハイブリッドセンサーキナーゼが欠損されている宿主細胞を使用することにより、導入された本発明ヒスチジンキナーゼからの細胞内信号伝達量を反映する当該形質転換細胞の生育量の変化、形態の変化、形状の変化、細胞内での特定物質の生合成量の変化、特定物質の代謝量の変化等が大きくなるために、当該形質転換細胞の抗菌活性物質に対する感受性は増強される。このように抗菌活性物質に対する感受性が増強された形質転換細胞は、被験物質の抗菌活性検定や当該検

定を用いた抗菌活性物質の探索により有用である。

具体的には、*Saccharomyces cerevisiae*等の出芽酵母由来の浸透圧センサー機能を有する蛋白質のアミノ酸配列をコードする塩基配列からなるSLN1遺伝子を欠損させた株 (Maeda T et al. Nature:369 242-245(1994)) に本発明ヒスチジinkinナーゼを導入した場合、欠損されたSLN1の代わりに本発明ヒスチジinkinナーゼが信号伝達を行うことによって、導入された本発明ヒスチジinkinナーゼからの細胞内信号伝達量を宿主細胞の生育量を指標としてより明確に検出できる。即ち、被験物質が本発明ヒスチジinkinナーゼに作用して、本発明ヒスチジinkinナーゼからの宿主細胞内の信号伝達量が変わると、当該形質転換出芽酵母の生育量の変化として明確に測定できる。また、大腸菌由来のハイブリッドセンサーkinナーゼであるRcsC遺伝子の欠損株、分裂酵母の細胞周期制御にかかわるPHK1~3遺伝子の欠損株、*Vibrio harveyi*の細胞密度感受性の発光制御に関わるLuxN欠損株及びシロイヌナズナのサイトカニン受容体CRE1欠損株等も好ましい態様の一例としてあげることができる。

【0037】

(被験物質の抗菌活性検定方法)

被験物質の抗菌活性検定方法において、本発明ヒスチジinkinナーゼのアミノ酸配列をコードする塩基配列からなる遺伝子が導入されてなる形質転換細胞に被験物質を接触させる第一工程及び当該形質転換細胞を培養する第二工程の具体的な例としては、例えば、当該形質転換細胞を、被験物質を含む培地で培養する方法をあげることができる。当該形質転換細胞の培養は、液体培地中にて培養する液体培養や、前記液体培地に寒天等を加えた固体培地上にて培養する固体培養等いずれの形態であってもよいが、前記培地中の被験物質の濃度としては、例えば、約1 nM~約1 mMをあげることができ、好ましくは、約10 nM~約100 μ Mがあげられる。培養時間としては、例えば、1時間以上3日程度をあげることができ、好ましくは、25時間から2日程度があげられる。尚、被験物質の抗菌活性の検定する場合には、被験物質を含む培地は抗菌活性物質非添加培地を使用すればよい。

【0038】

このようにして、抗菌活性検定方法により測定された、被験物質として異なる2種以上の物質（例えば、異なる2種以上の物質のうち、少なくとも一つの物質が抗菌活性を有さない物質であることが好ましい。）を各々独立して用いた区における、細胞内信号伝達量又はそれに相関する指標値を比較することにより得られる差異に基づき前記物質の抗菌活性を評価することができる。

【0039】

具体的には、例えば、PTP2 Tyrosine phosphatase遺伝子（Ota et al, Proc.N. A.sci.USA, 89, 2355-2359（1992））が導入されたSLN1遺伝子欠損株であるTM182（SLN1Δ）株（Maeda T et al. Nature:369 242-245(1994)）を宿主細胞として作製された形質転換細胞（即ち、本発明ヒスチジンキナーゼからの細胞内信号伝達によって細胞生育が直接的に制御される機能を有する形質転換細胞）を使用する場合には、炭素源としてグルコースを用いた培地（寒天培地又は液体培地）、例えば、Glu-Ura-Leu培地での当該形質転換細胞の生育量を指標として抗菌活性を測定すればよい。被験物質を加えたGlu-Ura-Leu培地（抗菌活性物質を含まない培地）を用いた場合、当該形質転換細胞の生育を阻害する被験物質は抗菌活性を有すると評価することができる。尚、対照として、炭素源としてグルコースの代わりにガラクトースを用いた培地、例えば、Gal-Ura-Leu培地、での当該形質転換細胞の生育が、被験物質の有無に関わらず認められることを調べてもよい。

【0040】

Phks遺伝子欠損株である分裂酵母を宿主細胞として作製された形質転換細胞（即ち、本発明ヒスチジンキナーゼからの細胞内信号伝達によって細胞周期が直接的に制御される機能を有する形質転換細胞）を使用する場合には、当該分裂酵母の分裂様式を顕微鏡下に観察すればよい。被験物質を含みかつ抗菌活性を有する物質を含まない培地を用いた場合、当該形質転換細胞の分裂細胞の細胞長を短くさせる被験物質は抗菌活性を有すると評価することができる。

次に、cps-LacZが導入されたRcsC遺伝子欠損大腸菌を宿主細胞として作製された形質転換細胞を使用する場合には、X-Galの発色を寒天培地又は液体培地で観察すればよい（Suzuki et al. Plant Cell Physiol 42:107-113(2001)）。被験物質を含みかつ抗菌活性を有する物質を含まない培地を用いた場合、当該形質転換

細胞を青色に着色させうる被験物質は抗菌活性を有すると評価することができる。

また、LuxN遺伝子欠損*V. harveyi*を宿主細胞として作製された形質転換細胞（即ち、本発明ヒスチジinkinナーゼからの細胞内信号伝達によって生物発光が直接的に制御される機能を有する形質転換細胞）を使用する場合には、当該形質転換微生物が発する蛍光を観察すればよい。被験物質を含みかつ抗菌活性を有する物質を含まない培地を用いた場合、当該形質転換細胞に蛍光を発光させうる被験物質は抗菌活性を有すると評価することができる。

【0041】

さらに、上述の検定方法により評価された抗菌活性に基づき抗菌活性物質を選抜することにより抗菌活性物質を探索することもできる。

【0042】

【発明の効果】

本発明によって、抗菌活性物質に対する感受性が増強された形質転換細胞を提供可能にし、さらに当該形質転換細胞を使用する被験物質の抗菌活性検定方法、及び当該方法を使用する抗菌活性物質の探索方法等を提供可能にした。

【0043】

【実施例】

以下、実施例を挙げてさらに詳細に本発明を説明するが、本発明はこれらに限定されるものではない。

【0044】

（実施例1）灰色カビ病糸状菌の細胞膜貫通領域を有さない浸透圧感受性ヒスチジinkinナーゼBcOS-1遺伝子の単離

始めに、灰色カビ病菌から全RNAを調製した。ポテトデキストロース寒天培地（PDA培地、日水製薬）上で生育された灰色カビ病糸状菌（*Botryotinia fuckeliana*）Bc-16株の菌糸100mgをマイクロスパチュラでかきとり、これを液体窒素中で乳鉢及び乳棒を用いて破碎した。凍結された破碎粉体からRNeasy Plant Mini Kit（QIAGEN）を用いてRNAを単離した。凍結された破碎粉体を液体窒素とともに50mlサンプルチューブに移し、液体窒素が蒸発してなくなった後、キットに添付さ

れたバッファーRLCに1ml当たり10 μ lのメルカプトエタノールが添加された溶液を加えて攪拌した。さらに、数回のピペッティングで破碎粉体をよく分散させ56℃で3分間保温した。その後、破碎粉体を含む溶液をキットに添付されたQIAshredder spin columnに供し2分間、8,000 x gで遠心分離した。ろ過上清を新しいサンプルチューブに移して、0.5倍容の99.5%エタノールを加えてピペッティングでよく混合した。この混合液をキットに添付されたRNeasy mini spin columnに供し1分間、8,000 x gで遠心分離した。ろ液を捨て、キットに添付されたバッファーRW1を700 μ l加えて1分間、8,000 x gで遠心分離し、ろ液を廃棄した。さらに、キットに添付されたバッファーRPEを500 μ l加えて1分間、8,000 x gで遠心分離し、ろ液を廃棄した。この操作を2回繰り返した。最後に、上部フィルター分部を新しいサンプルチューブに移して、キットに添付されたRNase-free滅菌水30 μ lを供し1分間、8,000 x gで遠心分離し、ろ液に総RNAを溶出した。この溶出操作を2回繰り返した。溶出された全RNAは260 nmの吸光度から322 μ g/mlの濃度であった。

次に、全RNAを鋳型としてcDNAをThermoScript RT-PCR System (Invitrogen) を用いて合成した。キットに添付された50mM Oligo(dT)₂₀ 1.0 μ l及び10mM dNTP Mix 2.0 μ lに、全RNA 2.7 μ l及び滅菌蒸留水 6.3 μ lが混合された溶液を65℃で5分間処理し氷上で急冷した。この溶液に、キットに添付された5x cDNA Synthesis Bufferを4 μ l、0.1M DTTを1 μ l、RNase OUTを1 μ l、ThermoScript RTを1 μ l、滅菌蒸留水を1 μ l加えて50℃で60分間反応を行い、その後85℃で5分間の加熱処理で反応を停止した。さらに、この反応液にキットに添付されたRNaseHを1 μ l添加し37℃で20分間反応し鋳型のRNAを分解し、cDNAを合成した。

このcDNAを鋳型として、灰色カビ病糸状菌のBcOS-1 遺伝子をPCRで増幅した。配列番号3に示される塩基配列からなるオリゴヌクレオチド及び配列番号4に示される塩基配列からなるオリゴヌクレオチドをプライマーとしてPCR反応を行い、配列番号2で示される塩基配列を有するDNAを増幅した。PCR反応は、KOD-Plus-(TOYOBO)を用いて、94℃で2分間保温し、次いで94℃で15秒間、55℃で30秒間、68℃で6分間のサイクルを35サイクル繰り返す増幅条件下で行った。尚、PCR反応液(50 μ l)は、上記cDNAを2 μ l、10x Bufferを5 μ l、2mM dNTPsを5 μ l、25mM MgS

O₄を2 μ l、10 μ Mオリゴヌクレオチドプライマーを各々1 μ l、滅菌蒸留水を33 μ l、KOD-Plus-を1 μ l添加することにより調製された。反応後、反応液の一部を0.8%アガロースゲル電気泳動で分離し、エチジウムブロマイド染色物ことによって約4 kbのBcOS-1遺伝子が増幅されたことを確認した。

【 0 0 4 5 】

(実施例 2) 灰色カビ病糸状菌のBcOS-1遺伝子の発現プラスミド構築と形質転換酵母の作製

酵母-大腸菌のシャトルベクターp415ADH (ATCC87312) に灰色カビ病糸状菌のBcOS-1遺伝子をクローニングした。実施例 1 で調製されたBcOS-1遺伝子断片を含む反応液を、QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN) を用いて添付のマニュアルに従って精製した。精製されたBcOS-1遺伝子を制限酵素SpeI及びPstIで消化し、同時に、シャトルベクターp415ADHも制限酵素SpeI及びPstIで消化し、0.8%アガロースゲル電気泳動で分離して切り出した。QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN) を用いて添付のマニュアルに従ってアガロースゲルよりBcOS-1を含む遺伝子断片及びシャトルベクターを回収した。Ligation Kit Ver.2 (TaKaRa) を用いて添付のマニュアルに従って、シャトルベクターのマルチクローニング部位のSpeIとPstIとの間にBcOS-1遺伝子断片を挿入し、発現プラスミドpADHBcOS1を構築した。得られた発現プラスミドの塩基配列は、BigDye terminator v3.0 Cycle Sequence FS Ready Reaction Kit (Applied Biosystems)を用いて添付のマニュアルに従ってシーケンス反応を行い、DNAシーケンサー3100で解析した。シーケンス反応はプライマーとして、配列番号5～12に示される塩基配列からなるオリゴヌクレオチドを用い、96℃で10秒間、50℃で5秒間、60℃で4分間のサイクルを30サイクル繰り返す増幅条件下で行った。その結果、配列番号2に示された塩基配列を得、BcOS-1遺伝子であることが確認された。

調製された発現プラスミドpADHBcOS1をGeitz RD & Woods RA (1994) Molecular Genetics of Yeast: Practical Approaches ed. Johnson JA, Oxford University Press p124-134記載の方法に従って、出芽酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) AH22株 (IFO10144) 及びMaeda T et.al. (1994) Nature vol.369, p242-245記載のTM182株に遺伝子導入した。得られる形質転換出芽酵母では、ロイシンの栄養

要求性が消失することを利用し、形質転換出芽酵母AH22株 (AH22-BcOS1) はGlu-Leu寒天培地で選抜し、形質転換出芽酵母TM182株 (TM182-BcOS1) はGal-Ura-Leu寒天培地で選抜した。得られたTM182-BcOS1は、Glu-Ura-Leu培地に移植しても生育することを確認した。

【 0 0 4 6 】

(実施例 3) 形質転換出芽酵母の抗菌活性物質感受性試験

実施例 2 で作製された形質転換出芽酵母AH22-BcOS1をGlu-Leu培地中30℃で18時間振とう培養した。対照として、AH22株を同様に、Glu培地中30℃で18時間振とう培養した。それぞれの増殖された形質転換出芽酵母の菌懸濁液における600 nmの吸光度を測定し、吸光度が0.1となるよう滅菌蒸留水で希釈された菌懸濁液を調製した。さらに、形質転換出芽酵母AH22-BcOS1がGlu-Leu培地で200倍に希釈された菌懸濁液と、AH22株がGlu培地で200倍に希釈された菌懸濁液とを調製した。化学式(1)～(3)に示される3種類の化合物(化合物(1)～(3))が各々60 ppmの濃度になるようジメチルスルフォキシド(DMSO)に溶解された溶液、化学式(4)及び(5)に示される2種類の化合物(化合物(4)及び(5))が2000 ppmの濃度になるようジメチルスルフォキシド(DMSO)に溶解された溶液、及び、化学式(6)及び(7)に示される2種類の化合物(化合物(6)及び(7))が20 ppmの濃度になるようジメチルスルフォキシド(DMSO)に溶解された溶液を調製し、当該化合物DMSO溶液と対照としてDMSOとがそれぞれ各穴に2.0 μ lずつ2箇所に分注されたマイクロプレートを作製した。その内の1枚には、上記のように希釈調製された形質転換出芽酵母AH22-BcOS1の菌懸濁液を200 μ lずつ分注し30℃で48時間静置培養した。もう1枚には、上記のように希釈調製された対照酵母AH22株の菌懸濁液を200 μ lずつ分注し30℃で48時間静置培養した。培養後、マイクロプレートリーダーで各穴の600 nmの吸光度を測定した。

同様に、実施例 2 で作製された形質転換出芽酵母TM182-BcOS1をGlu-Ura-Leu培地中30℃で18時間培養した。増殖された形質転換出芽酵母の菌懸濁液の600 nmにおける吸光度を測定し、吸光度が0.1となるよう滅菌蒸留水で希釈された菌懸濁液を調製した。さらに、形質転換出芽酵母TM182-BcOS1がGlu-Ura-Leu培地で200倍に希釈された菌懸濁液と、対照としてGal-Ura-Leu培地で200倍に希釈された菌懸

濁液とを調製した。化学式(1)～(3)に示される3種類の化合物(化合物(1)～(3))が各々60 ppmの濃度になるようジメチルスルフォキシド(DMSO)に溶解された溶液、化学式(4)及び(5)に示される2種類の化合物(化合物(4)及び(5))が2000 ppmの濃度になるようジメチルスルフォキシド(DMSO)に溶解された溶液、及び、化学式(6)及び(7)に示される2種類の化合物(化合物(6)及び(7))が20 ppmの濃度になるようジメチルスルフォキシド(DMSO)に溶解された溶液を調製し、当該化合物DMSO溶液と対照としてDMSOとがそれぞれ各穴に2.0 μ lずつ2箇所に分注されたマイクロプレートを2枚作製した。その内の1枚には、上記のようにGlu-Ura-Leu培地で希釈調製された形質転換出芽酵母TM182-Bc0S1の菌懸濁液を200 μ lずつ分注し30℃で67時間静置培養した。もう1枚には、上記のように、対照としてGal-Ura-Leu培地で希釈調製された形質転換出芽酵母TM182-Bc0S1の菌懸濁液を200 μ lずつ分注し30℃で67時間静置培養した。培養後、マイクロプレートリーダーで各穴の600 nmの吸光度を測定した。

表1に化学式(1)～(7)で示される化合物(化合物(1)～(7))について、形質転換出芽酵母及びその対照である出芽酵母の両者の生育度を示した。形質転換出芽酵母及びその対照である出芽酵母の両者の生育度は、前記化合物の濃度が0 ppmの場合の600 nmにおける吸光度を100として、相対値を百分率で表した。TM182-Bc0S1の各被験物質による生育の阻害度は、AH22-Bc0S1の各被験物質による生育の阻害度より大きく、TM182-HIK1はAH22-Bc0S1と比較して抗菌活性物質に対する感受性が増強した形質転換細胞であることが確認された。

【 0 0 4 7 】

【表 1】

	出芽酵母の生育度(%)			
	AH22	AH22-BcOS1	TM182-BcOS1	
被験物質(最終濃度ppm)	Glu	Glu-Leu	Gal-Ura-Leu	Glu-Ura-Leu
化合物(1) (0.6ppm)	99	90	99	9
化合物(2) (0.6ppm)	99	92	98	11
化合物(3) (0.6ppm)	98	93	98	10
化合物(4) (20ppm)	96	45	102	10
化合物(5) (20ppm)	97	79	103	48
化合物(6) (0.2ppm)	99	81	99	8
化合物(7) (0.2ppm)	101	94	99	11

【0048】

(実施例4) ジカルボキシイミド系抗菌活性物質に抵抗性を示す灰色カビ病糸状菌のBcOS-1変異遺伝子の単離

実施例1で調製されたcDNAを鋳型として、Oshima, M. et.al. (2002) Phytopathology 92, p75-80記載のジカルボキシイミド系抗菌活性物質に抵抗性を示す灰色カビ病糸状菌のBcOS-1変異遺伝子をPCRで作製した。配列番号15に示される塩基配列からなるオリゴヌクレオチド及び配列番号4に示される塩基配列からなるオリゴヌクレオチドをプライマーとして第一回目のPCR反応を行い、配列番号14で示される塩基配列を有するDNAの部分遺伝子を増幅した。PCR反応は、KOD-Plus-(TOYOBO)を用いて、94℃で2分間保温し、次いで94℃で15秒間、55℃で30秒間、68℃で6分間のサイクルを35サイクル繰り返す増幅条件下で行った。尚、PCR反応液(50 μ l)は、上記cDNAを2 μ l、10x Bufferを5 μ l、2mM dNTPsを5 μ l、25mM MgSO₄を2 μ l、10 μ Mオリゴヌクレオチドプライマーを各々1 μ l、滅菌蒸留水を33 μ l、KOD-Plus-を1 μ l添加することにより調製された。反応後、実施例1で調製

されたcDNAを鋳型として、配列番号3に示される塩基配列からなるオリゴヌクレオチド及び反応液の1 μ lをプライマーとして第2回目のPCRを行った。反応条件は第一回目のPCRと同条件で行い、反応後、反応液の一部を0.8%アガロースゲル電気泳動で分離し、エチジウムブロマイド染色することによって約4 k bのBcOS-1変異遺伝子が増幅されたことを確認した。

【0049】

(実施例5) ジカルボキシイミド系抗菌活性物質に抵抗性を示す灰色カビ病糸状菌BcOS-1変異遺伝子の発現プラスミドの構築と形質転換出芽酵母の作製

最初に、ジカルボキシイミド系抗菌活性物質に抵抗性を示す灰色カビ病糸状菌BcOS-1変異遺伝子(以下、BcOS-1変異遺伝子と記すこともある。)をベクターpBluescript II SK(+) (TOYOBO)にサブクローニングした。実施例4で調製されたBcOS-1変異遺伝子を含む反応液を、QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN)を用いて添付のマニュアルに従って精製した。精製されたBcOS-1変異遺伝子を制限酵素SpeI及びPstIで消化し、同時に、ベクターpBluescript II SK(+)も制限酵素SpeI及びPstIで消化し、0.8%アガロースゲル電気泳動で分離して切り出した。QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN)を用いて添付のマニュアルに従ってアガロースゲルよりBcOS-1変異遺伝子を含む遺伝子断片及びベクターpBluescript II SK(+)を回収した。Ligation Kit Ver.2 (TaKaRa)を用いて、添付のマニュアルに従って、ベクターpBluescript II SK(+)のマルチクローニング部位のSpeIとPstIとの間にBcOS-1変異遺伝子を挿入し、プラスミドpBcOS1-I365Sを構築した。得られた発現プラスミドの塩基配列はBigDye terminator v3.0 Cycle Sequence FS Ready Reaction Kit (Applied Biosystems)を用いて添付のマニュアルに従ってシーケンス反応を行い、DNAシーケンサー3100で解析した。シーケンス反応はプライマーとして、配列番号7~12に示される塩基配列からなるオリゴヌクレオチドを用い、96℃で10秒間、50℃で5秒間、60℃で4分間のサイクルを30サイクル繰り返す増幅条件下で行った。その結果、配列番号14に示された塩基配列を得、BcOS-1変異遺伝子であることが確認された。

このように調製されたプラスミドpBcOS1-I365Sに含まれるBcOS-1変異遺伝子を酵母-大腸菌のシャトルベクターp415ADHにクローニングし発現プラスミドを構築し

た。プラスミドpBcOS1-I365Sを制限酵素SpeI及びPstIで消化し、同時に、シャトルベクターp415ADHも制限酵素SpeI及びPstIで消化した。これらを0.8%アガロースゲル電気泳動で分離してBcOS-1変異遺伝子断片及びシャトルベクターp415ADHを切り出し、QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN) を用いて添付のマニュアルに従ってアガロースゲルよりBcOS-1変異遺伝子断片とシャトルベクターを回収した。Ligation Kit Ver.2 (TaKaRa) を用いて、添付のマニュアルに従って、シャトルベクターのマルチクローニング部位のSpeIとPstIとの間にBcOS-1変異遺伝子を挿入し、発現プラスミドpADHBcOS1-I365Sを構築した。得られた発現プラスミドの塩基配列はBigDye terminator v3.0 Cycle Sequence FS Ready Reaction Kit (Applied Biosystems)を用い、添付のマニュアルに従ってシーケンス反応を行い、DNAシーケンサー3100で解析した。シーケンス反応はプライマーとして、配列番号5～12に示される塩基配列からなるオリゴヌクレオチドを用い、96℃で10秒間、50℃で5秒間、60℃で4分間のサイクルを30サイクル繰り返す増幅条件下で行った。その結果、配列番号14に示された塩基配列を得、BcOS-1変異遺伝子の発現プラスミドあることが確認された。

調製された発現プラスミドpADHBcOS1-I365Sを実施例2記載の方法に従って、出芽酵母TM182株に遺伝子導入した。得られる形質転換出芽酵母では、ロイシンの栄養要求性が消失することを利用し、形質転換出芽酵母TM182株 (TM182-BcOS1-I365S) はGal-Ura-Leu寒天培地で選抜した。得られたTM182-BcOS1-I365Sは、Glu-Ura-Leu培地に移植しても生育することを確認した。

【 0 0 5 0 】

(実施例6) 形質転換出芽酵母TM182-BcOS1-I365Sの抗菌活性物質感受性試験
実施例5で作製された形質転換出芽酵母TM182-BcOS1-I365SをGlu-Ura-Leu培地中30℃で18時間培養する。増殖された形質転換出芽酵母の菌懸濁液の600 nmにおける吸光度を測定し、吸光度が0.1となるよう滅菌蒸留水で希釈された菌懸濁液を調製する。さらに、形質転換出芽酵母TM182-BcOS1-I365SがGlu-Ura-Leu培地で200倍に希釈された菌懸濁液と、対照としてGal-Ura-Leu培地で200倍に希釈された菌懸濁液とを調製する。化学式(1)～(3)に示される3種類の化合物(化合物(1)～(3))が各々60 ppmの濃度になるようジメチルスルフォキシド(DMSO)に溶

解された溶液、化学式(4)及び(5)に示される2種類の化合物(化合物(4)及び(5))が2000 ppmの濃度になるようジメチルスルフォキシド(DMSO)に溶解された溶液、及び、化学式(6)及び(7)に示される2種類の化合物(化合物(6)及び(7))が20 ppmの濃度になるようジメチルスルフォキシド(DMSO)に溶解された溶液を調製し、当該化合物DMSO溶液と対照としてDMSOとがそれぞれ各穴に2.0 μ lずつ2箇所に分注されたマイクロプレートを作製する。その内の1枚には、上記のようにGlu-Ura-Leu培地で希釈調製された形質転換出芽酵母TM182-BcOS1-I365Sの菌懸濁液を200 μ lずつ分注し30℃で67時間静置培養する。もう1枚には、対照としてGal-Ura-Leu培地で希釈調製された形質転換出芽酵母TM182-BcOS1-I365Sの菌懸濁液を200 μ lずつ分注し30℃で67時間静置培養する。培養後、マイクロプレートリーダーで各穴の600 nmの吸光度を測定する。

【0051】

(実施例7) イネいもち病糸状菌の細胞膜貫通領域を有さない浸透圧感受性ヒスチジンキナーゼHIK1遺伝子の単離

始めに、イネいもち病糸状菌から全RNAを調製した。ポテトデキストロース寒天培地(PDA培地、日水製薬)上で生育されたイネいもち病糸状菌(*Pyricularia grisea*) P-37株の菌糸100mgをマイクロスパチュラでかきとり、これを液体窒素中で乳鉢及び乳棒を用いて破碎した。凍結された破碎粉体からRNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN)を用いてRNAを単離した。凍結された破碎粉体を液体窒素とともに50mlサンプルチューブに移し、液体窒素が蒸発してなくなった後、キットに添付されたバッファーRLCに1ml当たり10 μ lのメルカプトエタノールが添加された溶液を加えて攪拌した。さらに、数回のピペッティングで破碎粉体をよく分散させ56℃で3分間保温した。その後、破碎粉体を含む溶液をキットに添付されたQIAshredder spin columnに供し2分間、8,000 x gで遠心分離した。ろ過上清を新しいサンプルチューブに移して、0.5倍容の99.5%エタノールを加えてピペッティングでよく混合した。この混合液をキットに添付されたRNeasy mini spin columnに供し1分間、8,000 x gで遠心分離した。ろ液を捨て、キットに添付されたバッファーRW1を700 μ l加えて1分間、8,000 x gで遠心分離し、ろ液を廃棄した。さらに、キットに添付されたバッファーRPEを500 μ l加えて1分間、8,000 x gで

遠心分離し、ろ液を廃棄した。この操作を2回繰り返した。最後に、上部フィルター分部を新しいサンプルチューブに移して、キットに添付されたRNase-free滅菌水30 μ lを供し1分間、8,000 x gで遠心分離し、ろ液に総RNAを溶出した。この溶出操作を2回繰り返した。

次に、全RNAを鋳型としてcDNAをThermoScript RT-PCR System (Invitrogen) を用いて合成した。キットに添付された50mM Oligo(dT)₂₀ 1.0 μ l及び10mM dNTP Mix 2.0 μ lに、全RNA 9.0 μ lが混合された溶液を65℃で5分間処理し氷上で急冷した。この溶液に、キットに添付された5x cDNA Synthesis Bufferを4 μ l、0.1M DTTを1 μ l、RNase OUTを1 μ l、ThermoScript RTを1 μ l、滅菌蒸留水を1 μ l加えて50℃で60分間反応を行い、その後85℃で5分間の加熱処理で反応を停止した。さらに、この反応液にキットに添付されたRNaseHを1 μ l添加し37℃で20分間反応し鋳型のRNAを分解し、cDNAを合成した。

このcDNAを鋳型として、イネいもち病糸状菌のHIK1遺伝子をPCRで増幅した。配列番号18に示される塩基配列からなるオリゴヌクレオチド及び配列番号19に示される塩基配列からなるオリゴヌクレオチドをプライマーとしてPCR反応を行い、配列番号17で示される塩基配列を有するDNAを増幅した。PCR反応は、KOD-Plus-(TOYOBO)を用いて、94℃で2分間保温し、次いで94℃で15秒間、55℃で30秒間、68℃で6分間のサイクルを35サイクル繰り返す増幅条件下で行った。尚、PCR反応液(50 μ l)は、上記cDNAを2 μ l、10x Bufferを5 μ l、2mM dNTPsを5 μ l、25mM MgSO₄を2 μ l、10 μ Mオリゴヌクレオチドプライマーを各々1 μ l、滅菌蒸留水を33 μ l、KOD-Plus-を1 μ l添加することにより調製された。反応後、反応液の一部を1.0%アガロースゲル電気泳動で分離し、エチジウムブロマイド染色することによって約4 kbのHIK1遺伝子が増幅されたことを確認した。

【0052】

(実施例8) イネいもち病糸状菌のHIK1遺伝子の発現プラスミド構築と形質転換酵母の作製

クローニングベクターpBluescriptSKII(+)にイネいもち病糸状菌のHIK1遺伝子をクローニングした。実施例7で調製されたHIK1遺伝子断片を含む反応液を、QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN) を用いて添付のマニュアルに従って精製

した。精製されたHIK1遺伝子を制限酵素SpeI及びHindIIIで消化し、同時に、クローニングベクターpBluescriptSKII(+)(ストラタジーン社製)も制限酵素SpeI及びHindIIIで消化し、1.0%アガロースゲル電気泳動で分離して切り出した。QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN) を用いて添付のマニュアルに従ってアガロースゲルよりHIK1を含む遺伝子断片及びクローニングベクターを回収した。Ligation Kit Ver.2 (TaKaRa) を用いて添付のマニュアルに従って、クローニングベクターのマルチクローニング部位のSpeIとHindIIIとの間にHIK1遺伝子断片が挿入されたプラスミドpBlueHIK1を構築した。得られたプラスミドの塩基配列はBigDye terminator v3.0 Cycle Sequence FS Ready Reaction Kit (Applied Biosystems)を用いて添付のマニュアルに従ってシーケンス反応を行い、DNAシーケンサー3100で解析した。シーケンス反応はプライマーとして、配列番号20~29に示される塩基配列からなるオリゴヌクレオチドを用い、96℃で10秒間、50℃で5秒間、60℃で2分間のサイクルを35サイクル繰り返す増幅条件下で行った。その結果、配列番号17に示された塩基配列を得、HIK1遺伝子であることが確認された。

次に、酵母-大腸菌のシャトルベクターp415ADH (ATCC87312) にイネいもち病糸状菌のHIK1遺伝子を挿入した。上記のように調製されたプラスミドpBlueHIK1を制限酵素SpeI及びHindIIIで消化し、同時に、シャトルベクターp415ADH (ATCC87312) も制限酵素SpeI及びHindIIIで消化し、1.0%アガロースゲル電気泳動で分離して切り出した。QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN) を用いて添付のマニュアルに従ってアガロースゲルよりHIK1を含む遺伝子断片及びシャトルベクターを回収した。Ligation Kit Ver.2 (TaKaRa) を用いて添付のマニュアルに従って、シャトルベクターのマルチクローニング部位のSpeIとHindIIIとの間にHIK1遺伝子断片が挿入されたプラスミドpADHHIK1を構築した。

調製された発現プラスミドpADHHIK1をGeitz RD & Woods RA (1994) Molecular Genetics of Yeast: Practical Approaches ed. Johnson JA, Oxford University Press p124-134記載の方法に従って、出芽酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) A H22株 (IFO10144) 及びMaeda T et.al. (1994) Nature vol.369, p242-245記載のTM182株に遺伝子導入した。得られる形質転換出芽酵母では、ロイシンの栄養

要求性が消失することを利用し、形質転換出芽酵母AH22株 (AH22-HIK1) はGlu-Leu寒天培地で選抜し、形質転換出芽酵母TM182株 (TM182-HIK1) はGal-Ura-Leu寒天培地で選抜した。得られたTM182-HIK1は、Glu-Ura-Leu培地に移植しても生育することを確認した。

【0053】

(実施例9) 形質転換出芽酵母の抗菌活性物質感受性試験

実施例8で作製された形質転換出芽酵母AH22-HIK1をGlu-Leu培地中30℃で24時間振とう培養した。対照として、AH22株を同様に、Glu培地中30℃で24時間振とう培養した。それぞれの増殖された形質転換出芽酵母の菌懸濁液の600 nmにおける吸光度を測定し、吸光度が0.1となるようそれぞれの培地で希釈された菌懸濁液を調製した。さらに、形質転換出芽酵母AH22-HIK1がGlu-Leu培地で50倍に希釈された菌懸濁液と、AH22株がGlu培地で50倍に希釈された菌懸濁液とを調製した。化学式(1)～(3)に示される3種類の化合物(化合物(1)～(3))が各々200 ppmの濃度になるようジメチルスルフォキシド(DMSO)に溶解された溶液、化学式(4)及び(5)に示される2種類の化合物(化合物(4)及び(5))が600 ppmの濃度になるようジメチルスルフォキシド(DMSO)に溶解された溶液、及び、化学式(6)及び(7)に示される2種類の化合物(化合物(6)及び(7))が20 ppmの濃度になるようジメチルスルフォキシド(DMSO)に溶解された溶液を調製し、当該化合物DMSO溶液と対照としてDMSOとがそれぞれ各穴に1.0 μ lずつ2箇所に分注されたマイクロプレートを作製した。その内の1枚には、上記のように希釈調製された形質転換出芽酵母AH22-HIK1の菌懸濁液を100 μ lずつ分注し30℃で23時間静置培養した。もう1枚には、上記のように希釈調製された対照酵母AH22株の菌懸濁液を100 μ lずつ分注し30℃で27時間静置培養した。培養後、マイクロプレートリーダーで各穴の600 nmの吸光度を測定した。

同様に、実施例8で作製された形質転換出芽酵母TM182-HIK1をGlu-Ura-Leu培地中30℃で24時間培養した。増殖された形質転換出芽酵母の菌懸濁液の600 nmの吸光度を測定し、吸光度が0.1となるようそれぞれの培地で希釈された菌懸濁液を調製した。さらに、形質転換出芽酵母TM182-HIK1がGlu-Ura-Leu培地で50倍に希釈された菌懸濁液と、対照としてGal-Ura-Leu培地で50倍に希釈された菌懸濁液

とを調製した。化学式(1)～(3)に示される3種類の化合物(化合物(1)～(3))が各々200 ppmの濃度になるようジメチルスルフォキシド(DMSO)に溶解された溶液、化学式(4)及び(5)に示される2種類の化合物(化合物(4)及び(5))が600 ppmの濃度になるようジメチルスルフォキシド(DMSO)に溶解された溶液、及び、化学式(6)及び(7)に示される2種類の化合物(化合物(6)及び(7))が20 ppmの濃度になるようジメチルスルフォキシド(DMSO)に溶解された溶液を調製し、当該化合物DMSO溶液と対照としてDMSOとがそれぞれ各穴に1.0 μ lずつ2箇所に分注されたマイクロプレートを作製した。その内の1枚には、上記のようにGlu-Ura-Leu培地で希釈調製された形質転換出芽酵母TM182-HIK1の菌懸濁液を100 μ lずつ分注し30℃で27時間静置培養した。もう1枚には、上記のように、対照としてGal-Ura-Leu培地で希釈調製された形質転換出芽酵母TM182-HIK1の菌懸濁液を100 μ lずつ分注し30℃で27時間静置培養した。培養後、マイクロプレートリーダーで各穴の600 nmの吸光度を測定した。

表2に化学式(1)～(7)で示される化合物(化合物(1)～(7))について、形質転換出芽酵母及びその対照である出芽酵母の両者の生育度を示した。形質転換出芽酵母及びその対照の出芽酵母の両者の生育度は、前記化合物濃度が0 ppmの場合における600 nmの吸光度を100として、相対値を百分率で表した。TM182-HIK1の各被験物質による生育の阻害度は、AH22-HIK1の各被験物質による生育の阻害度より大きく、TM182-HIK1はAH22-HIK1と比較して抗菌活性物質に対する感受性が増強した形質転換細胞であることが確認された。

【0054】

【表2】

	出芽酵母の生育度(%)			
	AH22	AH22-HIK1	TM182-HIK1	
被験物質(最終濃度ppm)	Glu	Glu-Leu	Gal-Ura-Leu	Glu-Ura-Leu
化合物(1) (2.0ppm)	85	89	100	62
化合物(2) (2.0ppm)	96	84	94	79
化合物(3) (2.0ppm)	99	104	100	30
化合物(4) (6.0ppm)	97	92	97	63
化合物(5) (6.0ppm)	93	99	106	22
化合物(6) (0.2ppm)	101	98	104	11
化合物(7) (0.2ppm)	89	102	87	9

【0055】

以下に、本発明において使用される培地の組成を記す。

(a) Glu培地

Bacto-yeast nitrogen base without amino acids 6.7g、Glucose 20g、Drop-out mix (1) 2.0g、Distilled water 1000ml

(b) Glu-Leu培地

Bacto-yeast nitrogen base without amino acids 6.7g、Glucose 20g、Drop-out mix (2) 2.0g、Distilled water 1000ml

(c) Glu-Ura-Leu培地

Bacto-yeast nitrogen base without amino acids 6.7g、Glucose 20g、Drop-out mix (3) 2.0g、

Distilled water 1000ml

(d) Gal-Ura-Leu培地

Bacto-yeast nitrogen base without amino acids 6.7g、

Galactose 20g、Drop-out mix (3) 2.0g、
Distilled water 1000ml

Drop-out mix (1):

Adenine 0.5g、Lysine 2.0g、Alanine 2.0g、Methionine 2.0g、Arginine 2.0g、para-Aminobenzoic acid 0.2g、Asparagine 2.0g、Phenylalanine 2.0g、Aspartic acid 2.0g、Proline 2.0g、Cysteine 2.0g、Serine 2.0g、Glutamine 2.0g、Threonine 2.0g、Glutamic acid 2.0g、Tryptophan 2.0g、Glycine 2.0g、Tyrosine 2.0g、Histidine 2.0g、Valine 2.0g、Inositol 2.0g、Isoleucine 2.0g、Uracil 2.0g、Leucine 10.0g、Distilled water 1000ml

Drop-out mix (2): Leucine (10.0g) を除いたDrop-out mix (1)

Drop-out mix (3): Uracil (2.0g) およびLeucine (10.0g) を除いたDrop-out mix (1)

(e) Glu寒天培地

培地 (a) に 2 % (W/V) の寒天が添加された固体培地。

(f) Glu-Leu寒天培地

培地 (b) に 2 % (W/V) の寒天が添加された固体培地。

(g) Glu-Ura-Leu寒天培地

培地 (c) に 2 % (W/V) の寒天が添加された固体培地。

(h) Gal-Ura-Leu寒天培地

培地 (d) に 2 % (W/V) の寒天が添加された固体培地。

【配列表】

<110> Sumitomo Chemical Co., Ltd.

<120> Transformed cells having enhanced sensitivity for antimicrobial substances and its use

<160> 29

<210> 1

<211> 1315

<212> PRT

<213> Botryotinia fuckeliana

<400> 1

Met	Glu	Asp	Ser	Thr	Ile	Ala	His	Thr	Thr	Ala	Ile	Leu	Gln	Thr	Leu
1				5					10					15	
Ala	Leu	Ser	Ser	Ile	Asp	Leu	Pro	Leu	Thr	Asn	Val	Tyr	Gly	Asn	Lys
			20					25					30		
Gly	Ile	Arg	Leu	Pro	Gly	Ala	Asp	Thr	Ala	Glu	Lys	Leu	Ala	Leu	Glu
		35					40					45			
Arg	Glu	Leu	Ala	Ala	Leu	Val	Ser	Arg	Val	Gln	Arg	Leu	Glu	Ala	Arg
		50				55					60				
Ala	Ile	Thr	Val	Asn	Asn	Gln	Thr	Leu	Pro	Asp	Thr	Pro	Asn	Glu	Leu
65				70					75					80	
Gly	Ala	Pro	Ser	Ala	Phe	Ala	Asp	Val	Leu	Thr	Gly	Ala	Pro	Ser	Arg
				85					90					95	
Ala	Ser	Lys	Ser	Thr	Thr	Ser	Arg	Gln	Gln	Leu	Val	Asn	Ser	Leu	Leu
				100					105					110	

Ala Ala Arg Glu Ala Pro Thr Gly Gly Glu Arg Pro Pro Lys Phe Thr
115 120 125
Lys Leu Ser Asp Glu Glu Leu Glu Ala Leu Arg Glu His Val Asp His
130 135 140
Gln Ser Lys Gln Leu Asp Ser Gln Lys Ser Glu Leu Ala Gly Val His
145 150 155 160
Ala Gln Leu Phe Glu Gln Lys Gln Arg Gln Glu Gln Ala Leu Asn Val
165 170 175
Leu Glu Val Glu Arg Val Ala Ala Leu Glu Arg Glu Leu Lys Lys His
180 185 190
Gln Gln Ala Asn Glu Ala Phe Gln Lys Ala Leu Arg Glu Ile Gly Glu
195 200 205
Ile Val Thr Ala Val Ala Arg Gly Asp Leu Ser Lys Lys Val Gln Ile
210 215 220
His Ser Val Glu Met Asp Pro Glu Ile Thr Thr Phe Lys Arg Val Ile
225 230 235 240
Asn Thr Met Met Asp Gln Leu Gln Ile Phe Ser Ser Glu Val Ser Arg
245 250 255
Val Ala Arg Glu Val Gly Thr Glu Gly Ile Leu Gly Gly Gln Ala Lys
260 265 270
Ile Ser Gly Val Asp Gly Thr Trp Lys Glu Leu Thr Asp Asn Val Asn
275 280 285
Val Met Ala Gln Asn Leu Thr Asp Gln Val Arg Glu Ile Ala Ser Val
290 295 300
Thr Thr Ala Val Ala His Gly Asp Leu Thr Gln Lys Ile Glu Arg Pro
305 310 315 320
Ala Gln Gly Glu Ile Leu Gln Leu Gln Gln Thr Ile Asn Thr Met Val
325 330 335
Asp Gln Leu Arg Thr Phe Ala Ala Glu Val Thr Arg Val Ala Arg Asp

340 345 350
Val Gly Thr Glu Gly Ile Leu Gly Gly Gln Ala Glu Ile Glu Gly Val
355 360 365
Gln Gly Met Trp Asn Thr Leu Ile Val Asn Val Asn Ala Met Ala Asn
370 375 380
Asn Leu Thr Thr Gln Val Arg Asp Ile Ala Ile Val Thr Thr Ala Val
385 390 395 400
Ala Lys Gly Asp Leu Thr Gln Lys Val Gln Ala Glu Cys Lys Gly Glu
405 410 415
Ile Lys Gln Leu Lys Glu Thr Ile Asn Ser Met Val Asp Gln Leu Gln
420 425 430
Gln Phe Ala Arg Glu Val Thr Lys Ile Ala Arg Glu Val Gly Thr Glu
435 440 445
Gly Arg Leu Gly Gly Gln Ala Thr Val His Asp Val Glu Gly Thr Trp
450 455 460
Arg Asp Leu Thr Glu Asn Val Asn Gly Met Ala Met Asn Leu Thr Thr
465 470 475 480
Gln Val Arg Glu Ile Ala Lys Val Thr Thr Ala Val Ala Arg Gly Asp
485 490 495
Leu Thr Lys Lys Ile Glu Val Glu Val Gln Gly Glu Ile Ala Ser Leu
500 505 510
Lys Asp Thr Ile Asn Thr Met Val Asp Arg Leu Ser Thr Phe Ala Phe
515 520 525
Glu Val Ser Lys Val Ala Arg Glu Val Gly Thr Asp Gly Thr Leu Gly
530 535 540
Gly Gln Ala Gln Val Asp Asn Val Glu Gly Lys Trp Lys Asp Leu Thr
545 550 555 560
Glu Asn Val Asn Thr Met Ala Arg Asn Leu Thr Thr Gln Val Arg Gly
565 570 575

Ile Ser Thr Val Thr Gln Ala Ile Ala Asn Gly Asp Met Ser Gln Lys
580 585 590
Ile Glu Val Ala Ala Ala Gly Glu Ile Leu Ile Leu Lys Glu Thr Ile
595 600 605
Asn Asn Met Val Asp Arg Leu Ser Ile Phe Ser Asn Glu Val Gln Arg
610 615 620
Val Ala Lys Asp Val Gly Val Asp Gly Lys Met Gly Gly Gln Ala Asp
625 630 635 640
Val Ala Gly Ile Gly Gly Arg Trp Lys Glu Ile Thr Thr Asp Val Asn
645 650 655
Thr Met Ala Asn Asn Leu Thr Thr Gln Val Arg Ala Phe Gly Asp Ile
660 665 670
Thr Asn Ala Ala Thr Asp Gly Asp Phe Thr Lys Leu Ile Thr Val Glu
675 680 685
Ala Ser Gly Glu Met Asp Glu Leu Lys Arg Lys Ile Asn Gln Met Val
690 695 700
Tyr Asn Leu Arg Asp Ser Ile Gln Arg Asn Thr Leu Ala Arg Glu Ala
705 710 715 720
Ala Glu Phe Ala Asn Arg Thr Lys Ser Glu Phe Leu Ala Asn Met Ser
725 730 735
His Glu Ile Arg Thr Pro Met Asn Gly Ile Ile Gly Met Thr Gln Leu
740 745 750
Thr Leu Asp Thr Asp Leu Thr Gln Tyr Gln Arg Glu Met Leu Asn Ile
755 760 765
Val His Asn Leu Ala Asn Ser Leu Leu Thr Ile Ile Asp Asp Ile Leu
770 775 780
Asp Leu Ser Lys Ile Glu Ala Asn Arg Met Ile Met Glu Glu Ile Pro
785 790 795 800
Tyr Thr Leu Arg Gly Thr Val Phe Asn Ala Leu Lys Thr Leu Ala Val

805	810	815
Lys Ala Asn Glu Lys Phe Leu Asp Leu Thr Tyr Arg Val Asp Ser Ser		
820	825	830
Val Pro Asp His Val Val Gly Asp Ser Phe Arg Leu Arg Gln Val Ile		
835	840	845
Leu Asn Leu Val Gly Asn Ala Ile Lys Phe Thr Glu His Gly Glu Val		
850	855	860
Ser Leu Thr Ile Gln Lys Ala Glu Gln Asp His Cys Ala Pro Asn Glu		
865	870	875
Tyr Ala Val Glu Phe Cys Val Ser Asp Thr Gly Ile Gly Ile Gln Ala		
885	890	895
Asp Lys Leu Asn Leu Ile Phe Asp Thr Phe Gln Gln Ala Asp Gly Ser		
900	905	910
Met Thr Arg Lys Phe Gly Gly Thr Gly Leu Gly Leu Ser Ile Ser Lys		
915	920	925
Arg Leu Val Asn Leu Met Arg Gly Asp Val Trp Val Lys Ser Gln Tyr		
930	935	940
Gly Lys Gly Ser Ser Phe Tyr Phe Thr Cys Thr Val Arg Leu Ala Thr		
945	950	955
Ser Asp Ile Ser Phe Ile Gln Lys Gln Leu Lys Pro Tyr Gln Gly His		
965	970	975
Asn Val Leu Phe Ile Asp Lys Gly Gln Thr Gly His Gly Lys Glu Ile		
980	985	990
Ile Thr Met Leu Thr Gln Leu Gly Leu Val Pro Val Val Val Asp Ser		
995	1000	1005
Glu Gln His Thr Ile Leu Leu Gly Asn Gly Arg Thr Lys Glu Lys Ile		
1010	1015	1020
Ala Ser Thr Tyr Asp Val Ile Val Val Asp Ser Ile Glu Ser Ala Arg		
1025	1030	1035
		1040

Lys Leu Arg Ser Ile Asp Glu Phe Lys Tyr Ile Pro Ile Val Leu Leu
1045 1050 1055
Ala Pro Val Ile His Val Ser Leu Lys Ser Ala Leu Asp Leu Gly Ile
1060 1065 1070
Thr Ser Tyr Met Thr Thr Pro Cys Leu Thr Ile Asp Leu Gly Asn Gly
1075 1080 1085
Met Ile Pro Ala Leu Glu Asn Arg Ala Ala Pro Ser Leu Ala Asp Asn
1090 1095 1100
Thr Lys Ser Phe Asp Ile Leu Leu Ala Glu Asp Asn Ile Val Asn Gln
1105 1110 1115 1120
Arg Leu Ala Val Lys Ile Leu Glu Lys Tyr His His Val Val Thr Val
1125 1130 1135
Val Gly Asn Gly Gln Glu Ala Leu Asp Ala Ile Lys Glu Lys Arg Tyr
1140 1145 1150
Asp Val Ile Leu Met Asp Val Gln Met Pro Ile Met Gly Gly Phe Glu
1155 1160 1165
Ala Thr Ala Lys Ile Arg Glu Tyr Glu Arg Ser Leu Gly Thr Gln Arg
1170 1175 1180
Thr Pro Ile Ile Ala Leu Thr Ala His Ala Met Leu Gly Asp Arg Glu
1185 1190 1195 1200
Lys Cys Ile Gln Ala Gln Met Asp Glu Tyr Leu Ser Lys Pro Leu Lys
1205 1210 1215
Gln Asn His Leu Ile Gln Thr Ile Leu Lys Cys Ala Thr Leu Gly Gly
1220 1225 1230
Ala Leu Leu Glu Lys Gly Arg Glu Val Arg Gln Ser Ala Asn Glu Glu
1235 1240 1245
Ser Pro Asn Ser Gln Asn Gly Pro Arg Gly Thr Gln His Pro Ala Ser
1250 1255 1260
Ser Pro Thr Pro Ala His Met Arg Pro Ala Ile Glu Pro Arg Ala Tyr

1265 1270 1275 1280
 Thr Thr Thr Gly Pro Ile Asn His Gly Ser Ala Glu Ser Pro Ser Leu
 1285 1290 1295
 Val Thr Ala Asp Ala Glu Asp Pro Leu Ala Arg Leu Leu Met Arg Ala
 1300 1305 1310
 His Ser Ser
 1315

<210> 2
 <211> 3948
 <212> DNA
 <213> Botryotinia fuckeliana

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(3948)

<400> 2
 atg gag gat tct aca ata gct cat act act gcg atc ctg caa act ctc 48
 Met Glu Asp Ser Thr Ile Ala His Thr Thr Ala Ile Leu Gln Thr Leu
 1 5 10 15

gca tta tcg agc atc gat ctt cca ctg acg aat gtt tac ggc aac aag 96
 Ala Leu Ser Ser Ile Asp Leu Pro Leu Thr Asn Val Tyr Gly Asn Lys
 20 25 30

ggg att agg tta cca ggt gca gat acg gca gag aag ctt gcc ctc gaa 144
 Gly Ile Arg Leu Pro Gly Ala Asp Thr Ala Glu Lys Leu Ala Leu Glu

35	40	45	
cga gaa ctt gcg gcc ttg gta tcc aga gtc caa aga tta gaa gca agg			192
Arg Glu Leu Ala Ala Leu Val Ser Arg Val Gln Arg Leu Glu Ala Arg			
50	55	60	
gcg atc aca gtc aat aat caa acc ctg ccc gat acg ccg aat gaa tta			240
Ala Ile Thr Val Asn Asn Gln Thr Leu Pro Asp Thr Pro Asn Glu Leu			
65	70	75	80
gga gcg cca tct gct ttc gca gat gta ctc act ggt gcc cca tcc cga			288
Gly Ala Pro Ser Ala Phe Ala Asp Val Leu Thr Gly Ala Pro Ser Arg			
85	90	95	
gcc tca aag agt act aca tcc cga caa cag ctc gta aat tcg ttg ctt			336
Ala Ser Lys Ser Thr Thr Ser Arg Gln Gln Leu Val Asn Ser Leu Leu			
100	105	110	
gcc gcc aga gaa gcg ccc acc ggc ggt gaa aga cct cct aaa ttt acg			384
Ala Ala Arg Glu Ala Pro Thr Gly Gly Glu Arg Pro Pro Lys Phe Thr			
115	120	125	
aaa tta agt gac gag gaa ctc gaa gca ctc cgc gaa cat gtc gac cat			432
Lys Leu Ser Asp Glu Glu Leu Glu Ala Leu Arg Glu His Val Asp His			
130	135	140	
caa tcg aaa caa ctc gat agt caa aaa tct gag ctg gcc ggt gta cat			480
Gln Ser Lys Gln Leu Asp Ser Gln Lys Ser Glu Leu Ala Gly Val His			
145	150	155	160

gct caa ctg ttt gag cag aag cag aga caa gaa caa gca ctc aac gtt 528

Ala Gln Leu Phe Glu Gln Lys Gln Arg Gln Glu Gln Ala Leu Asn Val

165

170

175

ctt gaa gtc gaa cgc gta gca gct ctc gaa aga gaa ctg aag aag cat 576

Leu Glu Val Glu Arg Val Ala Ala Leu Glu Arg Glu Leu Lys Lys His

180

185

190

caa caa gcc aac gag gct ttc caa aaa gct cta cgg gaa ata gga gag 624

Gln Gln Ala Asn Glu Ala Phe Gln Lys Ala Leu Arg Glu Ile Gly Glu

195

200

205

att gtc aca gct gta gct agg ggt gat ctc agt aag aag gta caa atc 672

Ile Val Thr Ala Val Ala Arg Gly Asp Leu Ser Lys Lys Val Gln Ile

210

215

220

cac tcc gtg gag atg gac cct gag att aca act ttc aag cgt gtt att 720

His Ser Val Glu Met Asp Pro Glu Ile Thr Thr Phe Lys Arg Val Ile

225

230

235

240

aat act atg atg gat caa ctt cag ata ttc tct agt gag gtt tct cgt 768

Asn Thr Met Met Asp Gln Leu Gln Ile Phe Ser Ser Glu Val Ser Arg

245

250

255

gta gct aga gag gtc ggc aca gaa ggt att ctc ggt gga caa gcc aag 816

Val Ala Arg Glu Val Gly Thr Glu Gly Ile Leu Gly Gly Gln Ala Lys

260

265

270

att tct ggt gtt gat ggt aca tgg aag gag ttg act gac aat gtc aac 864
Ile Ser Gly Val Asp Gly Thr Trp Lys Glu Leu Thr Asp Asn Val Asn
275 280 285

gtt atg gca caa aat ctc acc gat caa gtc cga gaa att gct tcc gtc 912
Val Met Ala Gln Asn Leu Thr Asp Gln Val Arg Glu Ile Ala Ser Val
290 295 300

act act gct gta gct cat gga gat ctc aca caa aag att gag aga cca 960
Thr Thr Ala Val Ala His Gly Asp Leu Thr Gln Lys Ile Glu Arg Pro
305 310 315 320

gcc cag ggt gag ata ctc caa ctg caa caa act atc aat acc atg gtg 1008
Ala Gln Gly Glu Ile Leu Gln Leu Gln Gln Thr Ile Asn Thr Met Val
325 330 335

gat caa ttg aga acg ttc gcc gcc gag gtc acc cgc gta gca aga gat 1056
Asp Gln Leu Arg Thr Phe Ala Ala Glu Val Thr Arg Val Ala Arg Asp
340 345 350

gta gga act gaa ggt att ctt ggg ggt caa gca gaa atc gaa ggc gtc 1104
Val Gly Thr Glu Gly Ile Leu Gly Gly Gln Ala Glu Ile Glu Gly Val
355 360 365

cag ggc atg tgg aac aca ttg ata gtg aac gtc aac gct atg gcc aat 1152
Gln Gly Met Trp Asn Thr Leu Ile Val Asn Val Asn Ala Met Ala Asn
370 375 380

aac ctc acc aca caa gtg cgc gat ata gcc att gtc aca aca gct gtc 1200

Asn Leu Thr Thr Gln Val Arg Asp Ile Ala Ile Val Thr Thr Ala Val
 385 390 395 400

gca aag gga gac ctg act caa aag gtc caa gca gaa tgt aag ggt gaa 1248
 Ala Lys Gly Asp Leu Thr Gln Lys Val Gln Ala Glu Cys Lys Gly Glu
 405 410 415

atc aag cag ttg aag gag act ata aat tcc atg gtg gac caa tta caa 1296
 Ile Lys Gln Leu Lys Glu Thr Ile Asn Ser Met Val Asp Gln Leu Gln
 420 425 430

caa ttt gcg cga gaa gtc acg aag att gct agg gag gtc ggt acc gaa 1344
 Gln Phe Ala Arg Glu Val Thr Lys Ile Ala Arg Glu Val Gly Thr Glu
 435 440 445

ggt aga ctg ggt gga caa gca aca gtg cat gat gtt gaa ggc act tgg 1392
 Gly Arg Leu Gly Gly Gln Ala Thr Val His Asp Val Glu Gly Thr Trp
 450 455 460

aga gac ctc acc gaa aat gtg aat ggt atg gcc atg aat ctt acg aca 1440
 Arg Asp Leu Thr Glu Asn Val Asn Gly Met Ala Met Asn Leu Thr Thr
 465 470 475 480

caa gta cga gag att gca aag gtt acc acc gct gtc gcc aga gga gat 1488
 Gln Val Arg Glu Ile Ala Lys Val Thr Thr Ala Val Ala Arg Gly Asp
 485 490 495

ttg acc aag aag att gaa gtc gag gtt cag gga gaa atc gct tcg ctg 1536
 Leu Thr Lys Lys Ile Glu Val Glu Val Gln Gly Glu Ile Ala Ser Leu

500

505

510

aaa gat acc atc aac acc atg gtg gac aga ctt agt aca ttc gct ttt 1584

Lys Asp Thr Ile Asn Thr Met Val Asp Arg Leu Ser Thr Phe Ala Phe

515

520

525

gag gtt agc aaa gtc gcc agg gag gtc gga act gat ggg act ctt ggt 1632

Glu Val Ser Lys Val Ala Arg Glu Val Gly Thr Asp Gly Thr Leu Gly

530

535

540

gga caa gcg caa gtt gat aac gtc gaa gga aag tgg aaa gac ctc act 1680

Gly Gln Ala Gln Val Asp Asn Val Glu Gly Lys Trp Lys Asp Leu Thr

545

550

555

560

gaa aat gtg aac acc atg gcc aga aac ttg act act caa gta cga ggt 1728

Glu Asn Val Asn Thr Met Ala Arg Asn Leu Thr Thr Gln Val Arg Gly

565

570

575

atc tcg act gtt aca caa gct att gcc aat gga gac atg agt cag aag 1776

Ile Ser Thr Val Thr Gln Ala Ile Ala Asn Gly Asp Met Ser Gln Lys

580

585

590

att gag gtt gct gct gcg ggt gaa ata ctc ata cta aag gaa acc ata 1824

Ile Glu Val Ala Ala Ala Gly Glu Ile Leu Ile Leu Lys Glu Thr Ile

595

600

605

aat aac atg gta gac aga ttg agt atc ttc tcc aac gaa gtg caa aga 1872

Asn Asn Met Val Asp Arg Leu Ser Ile Phe Ser Asn Glu Val Gln Arg

610

615

620

gtc gcc aaa gat gtg ggt gtg gat ggt aag atg ggt ggc caa gct gac 1920

Val Ala Lys Asp Val Gly Val Asp Gly Lys Met Gly Gly Gln Ala Asp

625

630

635

640

gtt gct ggg att ggc ggc cgt tgg aaa gag atc aca acg gat gtc aat 1968

Val Ala Gly Ile Gly Gly Arg Trp Lys Glu Ile Thr Thr Asp Val Asn

645

650

655

acc atg gct aac aac ttg aca acc caa gtg cgc gcc ttt ggt gat ata 2016

Thr Met Ala Asn Asn Leu Thr Thr Gln Val Arg Ala Phe Gly Asp Ile

660

665

670

act aac gcc gca acc gat ggc gac ttc aca aaa ttg atc act gtc gag 2064

Thr Asn Ala Ala Thr Asp Gly Asp Phe Thr Lys Leu Ile Thr Val Glu

675

680

685

gca tct gga gag atg gat gag ctg aag cga aag atc aac cag atg gtg 2112

Ala Ser Gly Glu Met Asp Glu Leu Lys Arg Lys Ile Asn Gln Met Val

690

695

700

tac aat ctg agg gac agt att caa aga aac acc ttg gct agg gag gct 2160

Tyr Asn Leu Arg Asp Ser Ile Gln Arg Asn Thr Leu Ala Arg Glu Ala

705

710

715

720

gcc gaa ttc gcc aat agg acg aag tct gaa ttc ttg gct aac atg tct 2208

Ala Glu Phe Ala Asn Arg Thr Lys Ser Glu Phe Leu Ala Asn Met Ser

725

730

735

cac gag att cga aca cct atg aac ggt atc att ggt atg act cag ttg 2256
His Glu Ile Arg Thr Pro Met Asn Gly Ile Ile Gly Met Thr Gln Leu
740 745 750

aca ctc gac acc gat ctt act caa tat caa cga gaa atg ctc aac att 2304
Thr Leu Asp Thr Asp Leu Thr Gln Tyr Gln Arg Glu Met Leu Asn Ile
755 760 765

gtt cac aac ttg gcc aac agt tta ttg acc atc att gat gat att ctc 2352
Val His Asn Leu Ala Asn Ser Leu Leu Thr Ile Ile Asp Asp Ile Leu
770 775 780

gat tta tca aag atc gaa gca aac cgt atg atc atg gag gag att cca 2400
Asp Leu Ser Lys Ile Glu Ala Asn Arg Met Ile Met Glu Glu Ile Pro
785 790 795 800

tac act ctt aga gga acc gtc ttc aac gcc ctc aag act ctc gct gtc 2448
Tyr Thr Leu Arg Gly Thr Val Phe Asn Ala Leu Lys Thr Leu Ala Val
805 810 815

aag gca aat gag aag ttc cta gac ctc act tac cgc gta gat agc tca 2496
Lys Ala Asn Glu Lys Phe Leu Asp Leu Thr Tyr Arg Val Asp Ser Ser
820 825 830

gtt cca gat cac gtg gtt ggt gat tca ttc cgt ctt cga caa gtt att 2544
Val Pro Asp His Val Val Gly Asp Ser Phe Arg Leu Arg Gln Val Ile
835 840 845

ctc aac ttg gtt gga aac gct atc aag ttc aca gag cat ggt gaa gtt 2592

Leu Asn Leu Val Gly Asn Ala Ile Lys Phe Thr Glu His Gly Glu Val

850

855

860

tcg ttg acc atc caa aaa gcc gag caa gat cat tgt gcg ccg aac gaa 2640

Ser Leu Thr Ile Gln Lys Ala Glu Gln Asp His Cys Ala Pro Asn Glu

865

870

875

880

tat gca gtc gag ttt tgt gtt tct gac act ggt atc ggt atc caa gct 2688

Tyr Ala Val Glu Phe Cys Val Ser Asp Thr Gly Ile Gly Ile Gln Ala

885

890

895

gat aag ctc aat ttg att ttc gac act ttc caa caa gct gac gga tct 2736

Asp Lys Leu Asn Leu Ile Phe Asp Thr Phe Gln Gln Ala Asp Gly Ser

900

905

910

atg acg agg aaa ttc gga ggt act ggt cta ggt cta tca att tcg aag 2784

Met Thr Arg Lys Phe Gly Gly Thr Gly Leu Gly Leu Ser Ile Ser Lys

915

920

925

aga ctt gta aac ctc atg cgt gga gat gtt tgg gtt aag agt cag tac 2832

Arg Leu Val Asn Leu Met Arg Gly Asp Val Trp Val Lys Ser Gln Tyr

930

935

940

gga aaa ggc agt tca ttc tac ttc acg tgt acc gtc cgc ctc gca acc 2880

Gly Lys Gly Ser Ser Phe Tyr Phe Thr Cys Thr Val Arg Leu Ala Thr

945

950

955

960

tca gat atc agt ttc att cag aaa caa ctc aag cca tat caa ggt cac 2928

Ser Asp Ile Ser Phe Ile Gln Lys Gln Leu Lys Pro Tyr Gln Gly His

965	970	975	
aat gtt ttg ttt atc gac aaa gga cag act ggc cat ggc aaa gaa ata			2976
Asn Val Leu Phe Ile Asp Lys Gly Gln Thr Gly His Gly Lys Glu Ile			
980	985	990	
atc act atg ctt aca caa ctt ggt ttg gta ccc gtt gtt gtt gac tct			3024
Ile Thr Met Leu Thr Gln Leu Gly Leu Val Pro Val Val Val Asp Ser			
995	1000	1005	
gag cag cac act att ctt ctc ggc aat gga aga acc aag gag aag att			3072
Glu Gln His Thr Ile Leu Leu Gly Asn Gly Arg Thr Lys Glu Lys Ile			
1010	1015	1020	
gct tca act tat gac gtg att gtt gtg gac tca att gag tcc gct cga			3120
Ala Ser Thr Tyr Asp Val Ile Val Val Asp Ser Ile Glu Ser Ala Arg			
1025	1030	1035	1040
aaa ctg cga tca atc gat gag ttc aag tat att cca att gtt ctc tta			3168
Lys Leu Arg Ser Ile Asp Glu Phe Lys Tyr Ile Pro Ile Val Leu Leu			
1045	1050	1055	
gct ccc gtt att cat gtc agc tta aag tct gct ttg gat ctt ggt atc			3216
Ala Pro Val Ile His Val Ser Leu Lys Ser Ala Leu Asp Leu Gly Ile			
1060	1065	1070	
act tct tac atg acc act cca tgt tta acg atc gat ctt ggc aat ggt			3264
Thr Ser Tyr Met Thr Thr Pro Cys Leu Thr Ile Asp Leu Gly Asn Gly			
1075	1080	1085	

atg att cct gct ttg gag aat cga gct gca ccc tca ttg gcg gac aac 3312

Met Ile Pro Ala Leu Glu Asn Arg Ala Ala Pro Ser Leu Ala Asp Asn

1090

1095

1100

aca aaa tcc ttc gac att ctc ttg gcc gaa gat aac atc gtc aat caa 3360

Thr Lys Ser Phe Asp Ile Leu Leu Ala Glu Asp Asn Ile Val Asn Gln

1105

1110

1115

1120

cgc tta gcg gtg aag att cta gaa aag tat cac cac gtc gtc aca gtc 3408

Arg Leu Ala Val Lys Ile Leu Glu Lys Tyr His His Val Val Thr Val

1125

1130

1135

gtt ggc aat ggt caa gaa gca cta gat gct atc aag gag aaa cga tac 3456

Val Gly Asn Gly Gln Glu Ala Leu Asp Ala Ile Lys Glu Lys Arg Tyr

1140

1145

1150

gat gtt att ctc atg gac gtt caa atg cca att atg gga gga ttc gaa 3504

Asp Val Ile Leu Met Asp Val Gln Met Pro Ile Met Gly Gly Phe Glu

1155

1160

1165

gca acc gct aag att aga gag tac gaa cgg agt ctt gga acg caa aga 3552

Ala Thr Ala Lys Ile Arg Glu Tyr Glu Arg Ser Leu Gly Thr Gln Arg

1170

1175

1180

acg cct att atc gca ctt aca gca cac gct atg ttg ggt gat cgc gaa 3600

Thr Pro Ile Ile Ala Leu Thr Ala His Ala Met Leu Gly Asp Arg Glu

1185

1190

1195

1200

aaa tgt att caa gcc caa atg gat gaa tat ctt tct aag cct ctg aaa 3648

Lys Cys Ile Gln Ala Gln Met Asp Glu Tyr Leu Ser Lys Pro Leu Lys

1205

1210

1215

caa aat cat ctt att cag acg atc ttg aaa tgt gca acc ctt gga ggt 3696

Gln Asn His Leu Ile Gln Thr Ile Leu Lys Cys Ala Thr Leu Gly Gly

1220

1225

1230

gca ttg ctc gag aag ggt agg gag gtt agg caa tcc gct aat gaa gag 3744

Ala Leu Leu Glu Lys Gly Arg Glu Val Arg Gln Ser Ala Asn Glu Glu

1235

1240

1245

agc ccc aat tcg caa aat ggt cct cgc ggt aca cag cat cct gca tca 3792

Ser Pro Asn Ser Gln Asn Gly Pro Arg Gly Thr Gln His Pro Ala Ser

1250

1255

1260

agt ccc aca cca gcc cat atg aga ccg gct atc gaa cct cgt gca tac 3840

Ser Pro Thr Pro Ala His Met Arg Pro Ala Ile Glu Pro Arg Ala Tyr

1265

1270

1275

1280

acg acc act ggc cct ata aat cat gga agt gca gag agt cct tca ctt 3888

Thr Thr Thr Gly Pro Ile Asn His Gly Ser Ala Glu Ser Pro Ser Leu

1285

1290

1295

gta acg gca gat gct gag gat cca ctt gcg agg ctt cta atg cgt gcg 3936

Val Thr Ala Asp Ala Glu Asp Pro Leu Ala Arg Leu Leu Met Arg Ala

1300

1305

1310

cat agc agc tag

3948

His Ser Ser Stop

1315

<210> 3

<211> 36

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Designed
oligonucleotide primer for PCR

<400> 3

tattcagaga ctagtatgga ggattctaca atagca 36

<210> 4

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Designed
oligonucleotide primer for PCR

<400> 4

cagatgaatc tgcagctagc tgctatgcgc acg 33

<210> 5

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Designed
oligonucleotide primer for sequencing

<400> 5

gatgtactca ctggtgcccc atcccgagcc 30

<210> 6

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Designed
oligonucleotide primer for sequencing

<400> 6

ctcaaacagt tgagcatgta caccggccag 30

<210> 7

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Designed
oligonucleotide primer for sequencing

<400> 7

acagaaggta ttctcggtgg acaagccaag 30

<210> 8

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Designed
oligonucleotide primer for sequencing

<400> 1

gctagggagg tcggtaccga aggtagactg 30

<210> 9

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Designed
oligonucleotide primer for sequencing

<400> 9

atcttctcca acgaagtgca aagagtcgcc 30

<210> 10

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Designed
oligonucleotide primer for sequencing

<400> 10

gaggagattc catacactct tagaggaacc 30

<210> 11

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Designed
oligonucleotide primer for sequencing

<400> 11

atcgacaaag gacagactgg ccatggc

27

<210> 12

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Designed
oligonucleotide primer for sequencing

<400> 12

atgccaatta tgggaggatt cgaagcaacc

30

<210> 13

<211> 1315

<212> PRT

<213> Botryotinia fuckeliana

<400> 13

Met Glu Asp Ser Thr Ile Ala His Thr Thr Ala Ile Leu Gln Thr Leu

1

5

10

15

Ala Leu Ser Ser Ile Asp Leu Pro Leu Thr Asn Val Tyr Gly Asn Lys
 20 25 30
 Gly Ile Arg Leu Pro Gly Ala Asp Thr Ala Glu Lys Leu Ala Leu Glu
 35 40 45
 Arg Glu Leu Ala Ala Leu Val Ser Arg Val Gln Arg Leu Glu Ala Arg
 50 55 60
 Ala Ile Thr Val Asn Asn Gln Thr Leu Pro Asp Thr Pro Asn Glu Leu
 65 70 75 80
 Gly Ala Pro Ser Ala Phe Ala Asp Val Leu Thr Gly Ala Pro Ser Arg
 85 90 95
 Ala Ser Lys Ser Thr Thr Ser Arg Gln Gln Leu Val Asn Ser Leu Leu
 100 105 110
 Ala Ala Arg Glu Ala Pro Thr Gly Gly Glu Arg Pro Pro Lys Phe Thr
 115 120 125
 Lys Leu Ser Asp Glu Glu Leu Glu Ala Leu Arg Glu His Val Asp His
 130 135 140
 Gln Ser Lys Gln Leu Asp Ser Gln Lys Ser Glu Leu Ala Gly Val His
 145 150 155 160
 Ala Gln Leu Phe Glu Gln Lys Gln Arg Gln Glu Gln Ala Leu Asn Val
 165 170 175
 Leu Glu Val Glu Arg Val Ala Ala Leu Glu Arg Glu Leu Lys Lys His
 180 185 190
 Gln Gln Ala Asn Glu Ala Phe Gln Lys Ala Leu Arg Glu Ile Gly Glu
 195 200 205
 Ile Val Thr Ala Val Ala Arg Gly Asp Leu Ser Lys Lys Val Gln Ile
 210 215 220
 His Ser Val Glu Met Asp Pro Glu Ile Thr Thr Phe Lys Arg Val Ile
 225 230 235 240
 Asn Thr Met Met Asp Gln Leu Gln Ile Phe Ser Ser Glu Val Ser Arg

245 250 255
Val Ala Arg Glu Val Gly Thr Glu Gly Ile Leu Gly Gly Gln Ala Lys
260 265 270
Ile Ser Gly Val Asp Gly Thr Trp Lys Glu Leu Thr Asp Asn Val Asn
275 280 285
Val Met Ala Gln Asn Leu Thr Asp Gln Val Arg Glu Ile Ala Ser Val
290 295 300
Thr Thr Ala Val Ala His Gly Asp Leu Thr Gln Lys Ile Glu Arg Pro
305 310 315 320
Ala Gln Gly Glu Ile Leu Gln Leu Gln Gln Thr Ile Asn Thr Met Val
325 330 335
Asp Gln Leu Arg Thr Phe Ala Ala Glu Val Thr Arg Val Ala Arg Asp
340 345 350
Val Gly Thr Glu Gly Ile Leu Gly Gly Gln Ala Glu Ser Glu Gly Val
355 360 365
Gln Gly Met Trp Asn Thr Leu Ile Val Asn Val Asn Ala Met Ala Asn
370 375 380
Asn Leu Thr Thr Gln Val Arg Asp Ile Ala Ile Val Thr Thr Ala Val
385 390 395 400
Ala Lys Gly Asp Leu Thr Gln Lys Val Gln Ala Glu Cys Lys Gly Glu
405 410 415
Ile Lys Gln Leu Lys Glu Thr Ile Asn Ser Met Val Asp Gln Leu Gln
420 425 430
Gln Phe Ala Arg Glu Val Thr Lys Ile Ala Arg Glu Val Gly Thr Glu
435 440 445
Gly Arg Leu Gly Gly Gln Ala Thr Val His Asp Val Glu Gly Thr Trp
450 455 460
Arg Asp Leu Thr Glu Asn Val Asn Gly Met Ala Met Asn Leu Thr Thr
465 470 475 480

Gln Val Arg Glu Ile Ala Lys Val Thr Thr Ala Val Ala Arg Gly Asp
 485 490 495
 Leu Thr Lys Lys Ile Glu Val Glu Val Gln Gly Glu Ile Ala Ser Leu
 500 505 510
 Lys Asp Thr Ile Asn Thr Met Val Asp Arg Leu Ser Thr Phe Ala Phe
 515 520 525
 Glu Val Ser Lys Val Ala Arg Glu Val Gly Thr Asp Gly Thr Leu Gly
 530 535 540
 Gly Gln Ala Gln Val Asp Asn Val Glu Gly Lys Trp Lys Asp Leu Thr
 545 550 555 560
 Glu Asn Val Asn Thr Met Ala Arg Asn Leu Thr Thr Gln Val Arg Gly
 565 570 575
 Ile Ser Thr Val Thr Gln Ala Ile Ala Asn Gly Asp Met Ser Gln Lys
 580 585 590
 Ile Glu Val Ala Ala Ala Gly Glu Ile Leu Ile Leu Lys Glu Thr Ile
 595 600 605
 Asn Asn Met Val Asp Arg Leu Ser Ile Phe Ser Asn Glu Val Gln Arg
 610 615 620
 Val Ala Lys Asp Val Gly Val Asp Gly Lys Met Gly Gly Gln Ala Asp
 625 630 635 640
 Val Ala Gly Ile Gly Gly Arg Trp Lys Glu Ile Thr Thr Asp Val Asn
 645 650 655
 Thr Met Ala Asn Asn Leu Thr Thr Gln Val Arg Ala Phe Gly Asp Ile
 660 665 670
 Thr Asn Ala Ala Thr Asp Gly Asp Phe Thr Lys Leu Ile Thr Val Glu
 675 680 685
 Ala Ser Gly Glu Met Asp Glu Leu Lys Arg Lys Ile Asn Gln Met Val
 690 695 700
 Tyr Asn Leu Arg Asp Ser Ile Gln Arg Asn Thr Leu Ala Arg Glu Ala

705	710	715	720
Ala Glu Phe	Ala Asn Arg Thr Lys Ser Glu Phe	Leu Ala Asn Met Ser	
725	730	735	
His Glu Ile Arg Thr Pro Met Asn Gly Ile Ile Gly Met Thr Gln Leu			
740	745	750	
Thr Leu Asp Thr Asp Leu Thr Gln Tyr Gln Arg Glu Met Leu Asn Ile			
755	760	765	
Val His Asn Leu Ala Asn Ser Leu Leu Thr Ile Ile Asp Asp Ile Leu			
770	775	780	
Asp Leu Ser Lys Ile Glu Ala Asn Arg Met Ile Met Glu Glu Ile Pro			
785	790	795	800
Tyr Thr Leu Arg Gly Thr Val Phe Asn Ala Leu Lys Thr Leu Ala Val			
805	810	815	
Lys Ala Asn Glu Lys Phe Leu Asp Leu Thr Tyr Arg Val Asp Ser Ser			
820	825	830	
Val Pro Asp His Val Val Gly Asp Ser Phe Arg Leu Arg Gln Val Ile			
835	840	845	
Leu Asn Leu Val Gly Asn Ala Ile Lys Phe Thr Glu His Gly Glu Val			
850	855	860	
Ser Leu Thr Ile Gln Lys Ala Glu Gln Asp His Cys Ala Pro Asn Glu			
865	870	875	880
Tyr Ala Val Glu Phe Cys Val Ser Asp Thr Gly Ile Gly Ile Gln Ala			
885	890	895	
Asp Lys Leu Asn Leu Ile Phe Asp Thr Phe Gln Gln Ala Asp Gly Ser			
900	905	910	
Met Thr Arg Lys Phe Gly Gly Thr Gly Leu Gly Leu Ser Ile Ser Lys			
915	920	925	
Arg Leu Val Asn Leu Met Arg Gly Asp Val Trp Val Lys Ser Gln Tyr			
930	935	940	

Gly Lys Gly Ser Ser Phe Tyr Phe Thr Cys Thr Val Arg Leu Ala Thr
945 950 955 960
Ser Asp Ile Ser Phe Ile Gln Lys Gln Leu Lys Pro Tyr Gln Gly His
965 970 975
Asn Val Leu Phe Ile Asp Lys Gly Gln Thr Gly His Gly Lys Glu Ile
980 985 990
Ile Thr Met Leu Thr Gln Leu Gly Leu Val Pro Val Val Val Asp Ser
995 1000 1005
Glu Gln His Thr Ile Leu Leu Gly Asn Gly Arg Thr Lys Glu Lys Ile
1010 1015 1020
Ala Ser Thr Tyr Asp Val Ile Val Val Asp Ser Ile Glu Ser Ala Arg
1025 1030 1035 1040
Lys Leu Arg Ser Ile Asp Glu Phe Lys Tyr Ile Pro Ile Val Leu Leu
1045 1050 1055
Ala Pro Val Ile His Val Ser Leu Lys Ser Ala Leu Asp Leu Gly Ile
1060 1065 1070
Thr Ser Tyr Met Thr Thr Pro Cys Leu Thr Ile Asp Leu Gly Asn Gly
1075 1080 1085
Met Ile Pro Ala Leu Glu Asn Arg Ala Ala Pro Ser Leu Ala Asp Asn
1090 1095 1100
Thr Lys Ser Phe Asp Ile Leu Leu Ala Glu Asp Asn Ile Val Asn Gln
1105 1110 1115 1120
Arg Leu Ala Val Lys Ile Leu Glu Lys Tyr His His Val Val Thr Val
1125 1130 1135
Val Gly Asn Gly Gln Glu Ala Leu Asp Ala Ile Lys Glu Lys Arg Tyr
1140 1145 1150
Asp Val Ile Leu Met Asp Val Gln Met Pro Ile Met Gly Gly Phe Glu
1155 1160 1165
Ala Thr Ala Lys Ile Arg Glu Tyr Glu Arg Ser Leu Gly Thr Gln Arg

1170 1175 1180
Thr Pro Ile Ile Ala Leu Thr Ala His Ala Met Leu Gly Asp Arg Glu
1185 1190 1195 1200
Lys Cys Ile Gln Ala Gln Met Asp Glu Tyr Leu Ser Lys Pro Leu Lys
 1205 1210 1215
Gln Asn His Leu Ile Gln Thr Ile Leu Lys Cys Ala Thr Leu Gly Gly
 1220 1225 1230
Ala Leu Leu Glu Lys Gly Arg Glu Val Arg Gln Ser Ala Asn Glu Glu
 1235 1240 1245
Ser Pro Asn Ser Gln Asn Gly Pro Arg Gly Thr Gln His Pro Ala Ser
 1250 1255 1260
Ser Pro Thr Pro Ala His Met Arg Pro Ala Ile Glu Pro Arg Ala Tyr
1265 1270 1275 1280
Thr Thr Thr Gly Pro Ile Asn His Gly Ser Ala Glu Ser Pro Ser Leu
 1285 1290 1295
Val Thr Ala Asp Ala Glu Asp Pro Leu Ala Arg Leu Leu Met Arg Ala
 1300 1305 1310
His Ser Ser
 1315

<210> 14

<211> 3948

<212> DNA

<213> Botryotinia fuckeliana

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(3948)

<400> 14

atg gag gat tct aca ata gct cat act act gcg atc ctg caa act ctc 48

Met Glu Asp Ser Thr Ile Ala His Thr Thr Ala Ile Leu Gln Thr Leu

1

5

10

15

gca tta tcg agc atc gat ctt cca ctg acg aat gtt tac ggc aac aag 96

Ala Leu Ser Ser Ile Asp Leu Pro Leu Thr Asn Val Tyr Gly Asn Lys

20

25

30

ggg att agg tta cca ggt gca gat acg gca gag aag ctt gcc ctc gaa 144

Gly Ile Arg Leu Pro Gly Ala Asp Thr Ala Glu Lys Leu Ala Leu Glu

35

40

45

cga gaa ctt gcg gcc ttg gta tcc aga gtc caa aga tta gaa gca agg 192

Arg Glu Leu Ala Ala Leu Val Ser Arg Val Gln Arg Leu Glu Ala Arg

50

55

60

gcg atc aca gtc aat aat caa acc ctg ccc gat acg ccg aat gaa tta 240

Ala Ile Thr Val Asn Asn Gln Thr Leu Pro Asp Thr Pro Asn Glu Leu

65

70

75

80

gga gcg cca tct gct ttc gca gat gta ctc act ggt gcc cca tcc cga 288

Gly Ala Pro Ser Ala Phe Ala Asp Val Leu Thr Gly Ala Pro Ser Arg

85

90

95

gcc tca aag agt act aca tcc cga caa cag ctc gta aat tcg ttg ctt 336

Ala Ser Lys Ser Thr Thr Ser Arg Gln Gln Leu Val Asn Ser Leu Leu

100

105

110

gcc gcc aga gaa gcg ccc acc ggc ggt gaa aga cct cct aaa ttt acg 384

Ala Ala Arg Glu Ala Pro Thr Gly Gly Glu Arg Pro Pro Lys Phe Thr

115

120

125

aaa tta agt gac gag gaa ctc gaa gca ctc cgc gaa cat gtc gac cat 432

Lys Leu Ser Asp Glu Glu Leu Glu Ala Leu Arg Glu His Val Asp His

130

135

140

caa tcg aaa caa ctc gat agt caa aaa tct gag ctg gcc ggt gta cat 480

Gln Ser Lys Gln Leu Asp Ser Gln Lys Ser Glu Leu Ala Gly Val His

145

150

155

160

gct caa ctg ttt gag cag aag cag aga caa gaa caa gca ctc aac gtt 528

Ala Gln Leu Phe Glu Gln Lys Gln Arg Gln Glu Gln Ala Leu Asn Val

165

170

175

ctt gaa gtc gaa cgc gta gca gct ctc gaa aga gaa ctg aag aag cat 576

Leu Glu Val Glu Arg Val Ala Ala Leu Glu Arg Glu Leu Lys Lys His

180

185

190

caa caa gcc aac gag gct ttc caa aaa gct cta cgg gaa ata gga gag 624

Gln Gln Ala Asn Glu Ala Phe Gln Lys Ala Leu Arg Glu Ile Gly Glu

195

200

205

att gtc aca gct gta gct agg ggt gat ctc agt aag aag gta caa atc 672

Ile Val Thr Ala Val Ala Arg Gly Asp Leu Ser Lys Lys Val Gln Ile

210

215

220

cac tcc gtg gag atg gac cct gag att aca act ttc aag cgt gtt att 720
 His Ser Val Glu Met Asp Pro Glu Ile Thr Thr Phe Lys Arg Val Ile
 225 230 235 240

aat act atg atg gat caa ctt cag ata ttc tct agt gag gtt tct cgt 768
 Asn Thr Met Met Asp Gln Leu Gln Ile Phe Ser Ser Glu Val Ser Arg
 245 250 255

gta gct aga gag gtc ggc aca gaa ggt att ctc ggt gga caa gcc aag 816
 Val Ala Arg Glu Val Gly Thr Glu Gly Ile Leu Gly Gly Gln Ala Lys
 260 265 270

att tct ggt gtt gat ggt aca tgg aag gag ttg act gac aat gtc aac 864
 Ile Ser Gly Val Asp Gly Thr Trp Lys Glu Leu Thr Asp Asn Val Asn
 275 280 285

gtt atg gca caa aat ctc acc gat caa gtc cga gaa att gct tcc gtc 912
 Val Met Ala Gln Asn Leu Thr Asp Gln Val Arg Glu Ile Ala Ser Val
 290 295 300

act act gct gta gct cat gga gat ctc aca caa aag att gag aga cca 960
 Thr Thr Ala Val Ala His Gly Asp Leu Thr Gln Lys Ile Glu Arg Pro
 305 310 315 320

gcc cag ggt gag ata ctc caa ctg caa caa act atc aat acc atg gtg 1008
 Ala Gln Gly Glu Ile Leu Gln Leu Gln Gln Thr Ile Asn Thr Met Val
 325 330 335

gat caa ttg aga acg ttc gcc gcc gag gtc acc cgc gta gca aga gat 1056

Asp Gln Leu Arg Thr Phe Ala Ala Glu Val Thr Arg Val Ala Arg Asp
 340 345 350

gta gga act gaa ggt att ctt ggg ggt caa gca gaa agc gaa ggc gtc 1104
 Val Gly Thr Glu Gly Ile Leu Gly Gly Gln Ala Glu Ser Glu Gly Val
 355 360 365

cag ggc atg tgg aac aca ttg ata gtg aac gtc aac gct atg gcc aat 1152
 Gln Gly Met Trp Asn Thr Leu Ile Val Asn Val Asn Ala Met Ala Asn
 370 375 380

aac ctc acc aca caa gtg cgc gat ata gcc att gtc aca aca gct gtc 1200
 Asn Leu Thr Thr Gln Val Arg Asp Ile Ala Ile Val Thr Thr Ala Val
 385 390 395 400

gca aag gga gac ctg act caa aag gtc caa gca gaa tgt aag ggt gaa 1248
 Ala Lys Gly Asp Leu Thr Gln Lys Val Gln Ala Glu Cys Lys Gly Glu
 405 410 415

atc aag cag ttg aag gag act ata aat tcc atg gtg gac caa tta caa 1296
 Ile Lys Gln Leu Lys Glu Thr Ile Asn Ser Met Val Asp Gln Leu Gln
 420 425 430

caa ttt gcg cga gaa gtc acg aag att gct agg gag gtc ggt acc gaa 1344
 Gln Phe Ala Arg Glu Val Thr Lys Ile Ala Arg Glu Val Gly Thr Glu
 435 440 445

ggt aga ctg ggt gga caa gca aca gtg cat gat gtt gaa ggc act tgg 1392
 Gly Arg Leu Gly Gly Gln Ala Thr Val His Asp Val Glu Gly Thr Trp

450	455	460	
aga gac ctc acc gaa aat gtg aat ggt atg gcc atg aat ctt acg aca 1440			
Arg Asp Leu Thr Glu Asn Val Asn Gly Met Ala Met Asn Leu Thr Thr			
465	470	475	480
caa gta cga gag att gca aag gtt acc acc gct gtc gcc aga gga gat 1488			
Gln Val Arg Glu Ile Ala Lys Val Thr Thr Ala Val Ala Arg Gly Asp			
	485	490	495
ttg acc aag aag att gaa gtc gag gtt cag gga gaa atc gct tcg ctg 1536			
Leu Thr Lys Lys Ile Glu Val Glu Val Gln Gly Glu Ile Ala Ser Leu			
	500	505	510
aaa gat acc atc aac acc atg gtg gac aga ctt agt aca ttc gct ttt 1584			
Lys Asp Thr Ile Asn Thr Met Val Asp Arg Leu Ser Thr Phe Ala Phe			
	515	520	525
gag gtt agc aaa gtc gcc agg gag gtc gga act gat ggg act ctt ggt 1632			
Glu Val Ser Lys Val Ala Arg Glu Val Gly Thr Asp Gly Thr Leu Gly			
	530	535	540
gga caa gcg caa gtt gat aac gtc gaa gga aag tgg aaa gac ctc act 1680			
Gly Gln Ala Gln Val Asp Asn Val Glu Gly Lys Trp Lys Asp Leu Thr			
545	550	555	560
gaa aat gtg aac acc atg gcc aga aac ttg act act caa gta cga ggt 1728			
Glu Asn Val Asn Thr Met Ala Arg Asn Leu Thr Thr Gln Val Arg Gly			
	565	570	575

atc tcg act gtt aca caa gct att gcc aat gga gac atg agt cag aag 1776
Ile Ser Thr Val Thr Gln Ala Ile Ala Asn Gly Asp Met Ser Gln Lys

580

585

590

att gag gtt gct gct gcg ggt gaa ata ctc ata cta aag gaa acc ata 1824
Ile Glu Val Ala Ala Ala Gly Glu Ile Leu Ile Leu Lys Glu Thr Ile

595

600

605

aat aac atg gta gac aga ttg agt atc ttc tcc aac gaa gtg caa aga 1872
Asn Asn Met Val Asp Arg Leu Ser Ile Phe Ser Asn Glu Val Gln Arg

610

615

620

gtc gcc aaa gat gtg ggt gtg gat ggt aag atg ggt ggc caa gct gac 1920
Val Ala Lys Asp Val Gly Val Asp Gly Lys Met Gly Gly Gln Ala Asp

625

630

635

640

gtt gct ggg att ggc ggc cgt tgg aaa gag atc aca acg gat gtc aat 1968
Val Ala Gly Ile Gly Gly Arg Trp Lys Glu Ile Thr Thr Asp Val Asn

645

650

655

acc atg gct aac aac ttg aca acc caa gtg cgc gcc ttt ggt gat ata 2016
Thr Met Ala Asn Asn Leu Thr Thr Gln Val Arg Ala Phe Gly Asp Ile

660

665

670

act aac gcc gca acc gat ggc gac ttc aca aaa ttg atc act gtc gag 2064
Thr Asn Ala Ala Thr Asp Gly Asp Phe Thr Lys Leu Ile Thr Val Glu

675

680

685

gca tct gga gag atg gat gag ctg aag cga aag atc aac cag atg gtg 2112
Ala Ser Gly Glu Met Asp Glu Leu Lys Arg Lys Ile Asn Gln Met Val
690 695 700

tac aat ctg agg gac agt att caa aga aac acc ttg gct agg gag gct 2160
Tyr Asn Leu Arg Asp Ser Ile Gln Arg Asn Thr Leu Ala Arg Glu Ala
705 710 715 720

gcc gaa ttc gcc aat agg acg aag tct gaa ttc ttg gct aac atg tct 2208
Ala Glu Phe Ala Asn Arg Thr Lys Ser Glu Phe Leu Ala Asn Met Ser
725 730 735

cac gag att cga aca cct atg aac ggt atc att ggt atg act cag ttg 2256
His Glu Ile Arg Thr Pro Met Asn Gly Ile Ile Gly Met Thr Gln Leu
740 745 750

aca ctc gac acc gat ctt act caa tat caa cga gaa atg ctc aac att 2304
Thr Leu Asp Thr Asp Leu Thr Gln Tyr Gln Arg Glu Met Leu Asn Ile
755 760 765

gtt cac aac ttg gcc aac agt tta ttg acc atc att gat gat att ctc 2352
Val His Asn Leu Ala Asn Ser Leu Leu Thr Ile Ile Asp Asp Ile Leu
770 775 780

gat tta tca aag atc gaa gca aac cgt atg atc atg gag gag att cca 2400
Asp Leu Ser Lys Ile Glu Ala Asn Arg Met Ile Met Glu Glu Ile Pro
785 790 795 800

tac act ctt aga gga acc gtc ttc aac gcc ctc aag act ctc gct gtc 2448

Tyr Thr Leu Arg Gly Thr Val Phe Asn Ala Leu Lys Thr Leu Ala Val
 805 810 815

aag gca aat gag aag ttc cta gac ctc act tac cgc gta gat agc tca 2496
 Lys Ala Asn Glu Lys Phe Leu Asp Leu Thr Tyr Arg Val Asp Ser Ser
 820 825 830

gtt cca gat cac gtg gtt ggt gat tca ttc cgt ctt cga caa gtt att 2544
 Val Pro Asp His Val Val Gly Asp Ser Phe Arg Leu Arg Gln Val Ile
 835 840 845

ctc aac ttg gtt gga aac gct atc aag ttc aca gag cat ggt gaa gtt 2592
 Leu Asn Leu Val Gly Asn Ala Ile Lys Phe Thr Glu His Gly Glu Val
 850 855 860

tcg ttg acc atc caa aaa gcc gag caa gat cat tgt gcg ccg aac gaa 2640
 Ser Leu Thr Ile Gln Lys Ala Glu Gln Asp His Cys Ala Pro Asn Glu
 865 870 875 880

tat gca gtc gag ttt tgt gtt tct gac act ggt atc ggt atc caa gct 2688
 Tyr Ala Val Glu Phe Cys Val Ser Asp Thr Gly Ile Gly Ile Gln Ala
 885 890 895

gat aag ctc aat ttg att ttc gac act ttc caa caa gct gac gga tct 2736
 Asp Lys Leu Asn Leu Ile Phe Asp Thr Phe Gln Gln Ala Asp Gly Ser
 900 905 910

atg acg agg aaa ttc gga ggt act ggt cta ggt cta tca att tcg aag 2784
 Met Thr Arg Lys Phe Gly Gly Thr Gly Leu Gly Leu Ser Ile Ser Lys

915	920	925	
aga ctt gta aac ctc atg cgt gga gat gtt tgg gtt aag agt cag tac			2832
Arg Leu Val Asn Leu Met Arg Gly Asp Val Trp Val Lys Ser Gln Tyr			
930	935	940	
gga aaa ggc agt tca ttc tac ttc acg tgt acc gtc cgc ctc gca acc			2880
Gly Lys Gly Ser Ser Phe Tyr Phe Thr Cys Thr Val Arg Leu Ala Thr			
945	950	955	960
tca gat atc agt ttc att cag aaa caa ctc aag cca tat caa ggt cac			2928
Ser Asp Ile Ser Phe Ile Gln Lys Gln Leu Lys Pro Tyr Gln Gly His			
965	970	975	
aat gtt ttg ttt atc gac aaa gga cag act ggc cat ggc aaa gaa ata			2976
Asn Val Leu Phe Ile Asp Lys Gly Gln Thr Gly His Gly Lys Glu Ile			
980	985	990	
atc act atg ctt aca caa ctt ggt ttg gta ccc gtt gtt gtt gac tct			3024
Ile Thr Met Leu Thr Gln Leu Gly Leu Val Pro Val Val Val Asp Ser			
995	1000	1005	
gag cag cac act att ctt ctc ggc aat gga aga acc aag gag aag att			3072
Glu Gln His Thr Ile Leu Leu Gly Asn Gly Arg Thr Lys Glu Lys Ile			
1010	1015	1020	
gct tca act tat gac gtg att gtt gtg gac tca att gag tcc gct cga			3120
Ala Ser Thr Tyr Asp Val Ile Val Val Asp Ser Ile Glu Ser Ala Arg			
1025	1030	1035	1040

aaa ctg cga tca atc gat gag ttc aag tat att cca att gtt ctc tta 3168

Lys Leu Arg Ser Ile Asp Glu Phe Lys Tyr Ile Pro Ile Val Leu Leu

1045

1050

1055

gct ccc gtt att cat gtc agc tta aag tct gct ttg gat ctt ggt atc 3216

Ala Pro Val Ile His Val Ser Leu Lys Ser Ala Leu Asp Leu Gly Ile

1060

1065

1070

act tct tac atg acc act cca tgt tta acg atc gat ctt ggc aat ggt 3264

Thr Ser Tyr Met Thr Thr Pro Cys Leu Thr Ile Asp Leu Gly Asn Gly

1075

1080

1085

atg att cct gct ttg gag aat cga gct gca ccc tca ttg gcg gac aac 3312

Met Ile Pro Ala Leu Glu Asn Arg Ala Ala Pro Ser Leu Ala Asp Asn

1090

1095

1100

aca aaa tcc ttc gac att ctc ttg gcc gaa gat aac atc gtc aat caa 3360

Thr Lys Ser Phe Asp Ile Leu Leu Ala Glu Asp Asn Ile Val Asn Gln

1105

1110

1115

1120

cgc tta gcg gtg aag att cta gaa aag tat cac cac gtc gtc aca gtc 3408

Arg Leu Ala Val Lys Ile Leu Glu Lys Tyr His His Val Val Thr Val

1125

1130

1135

gtt ggc aat ggt caa gaa gca cta gat gct atc aag gag aaa cga tac 3456

Val Gly Asn Gly Gln Glu Ala Leu Asp Ala Ile Lys Glu Lys Arg Tyr

1140

1145

1150

gat gtt att ctc atg gac gtt caa atg cca att atg gga gga ttc gaa 3504
 Asp Val Ile Leu Met Asp Val Gln Met Pro Ile Met Gly Gly Phe Glu
 1155 1160 1165

gca acc gct aag att aga gag tac gaa cgg agt ctt gga acg caa aga 3552
 Ala Thr Ala Lys Ile Arg Glu Tyr Glu Arg Ser Leu Gly Thr Gln Arg
 1170 1175 1180

acg cct att atc gca ctt aca gca cac gct atg ttg ggt gat cgc gaa 3600
 Thr Pro Ile Ile Ala Leu Thr Ala His Ala Met Leu Gly Asp Arg Glu
 1185 1190 1195 1200

aaa tgt att caa gcc caa atg gat gaa tat ctt tct aag cct ctg aaa 3648
 Lys Cys Ile Gln Ala Gln Met Asp Glu Tyr Leu Ser Lys Pro Leu Lys
 1205 1210 1215

caa aat cat ctt att cag acg atc ttg aaa tgt gca acc ctt gga ggt 3696
 Gln Asn His Leu Ile Gln Thr Ile Leu Lys Cys Ala Thr Leu Gly Gly
 1220 1225 1230

gca ttg ctc gag aag ggt agg gag gtt agg caa tcc gct aat gaa gag 3744
 Ala Leu Leu Glu Lys Gly Arg Glu Val Arg Gln Ser Ala Asn Glu Glu
 1235 1240 1245

agc ccc aat tcg caa aat ggt cct cgc ggt aca cag cat cct gca tca 3792
 Ser Pro Asn Ser Gln Asn Gly Pro Arg Gly Thr Gln His Pro Ala Ser
 1250 1255 1260

agt ccc aca cca gcc cat atg aga ccg gct atc gaa cct cgt gca tac 3840

Ser Pro Thr Pro Ala His Met Arg Pro Ala Ile Glu Pro Arg Ala Tyr
 1265 1270 1275 1280

acg acc act ggc cct ata aat cat gga agt gca gag agt cct tca ctt 3888
 Thr Thr Thr Gly Pro Ile Asn His Gly Ser Ala Glu Ser Pro Ser Leu
 1285 1290 1295

gta acg gca gat gct gag gat cca ctt gcg agg ctt cta atg cgt gcg 3936
 Val Thr Ala Asp Ala Glu Asp Pro Leu Ala Arg Leu Leu Met Arg Ala
 1300 1305 1310

cat agc agc tag 3948
 His Ser Ser Stop
 1315

<210> 15

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Designed
 oligonucleotide primer for PCR

<400> 15

ggtcaagcag aaagcgaagg cgtccagggc 30

<210> 16

<211> 1307

<212> PRT

<213> Magnapotrthe grisea

<400> 16

Met Ala Asp Ala Ala Thr Leu Ala Ala Val Ala Ala Ile Val Glu Asn

1 5 10 15

Ile Ala Thr Asn Ser Gly Ala Pro Gly Lys Asn Ala Ser Phe Arg Ser

20 25 30

Ser Thr Tyr Val Gln Leu Pro Gly Pro Glu Ser Asp Glu Lys Lys Gln

35 40 45

Leu Glu Arg Glu Leu Ala Ala Leu Val Ile Arg Val Gln Gln Leu Glu

50 55 60

Thr Arg Ala Asn Ala Ala Pro Ala Thr Ile Phe Pro Asp Thr Pro Asn

65 70 75 80

Glu Thr Ala His Ser Leu Phe Gly Asp Asp Ser Ser Ser Pro Thr Ser

85 90 95

Ser Ser Ser Gly Arg Glu Pro Lys Arg Leu Lys Ser Ala Ser Ser Thr

100 105 110

Thr Arg Asn Gly Phe Thr Thr Asp Gly Arg Pro Ser Lys Leu Asn Ala

115 120 125

Ile Thr Asp Glu Glu Leu Glu Gly Leu Arg Glu His Val Asp Gly Gln

130 135 140

Ser Arg Leu Leu Asp Ser Gln Arg Ala Glu Leu Asp Gly Val Asn Ala

145 150 155 160

Gln Leu Leu Glu Gln Lys Gln Leu Gln Glu Arg Ala Leu Ala Ile Ile

165 170 175

Glu Gln Glu Arg Val Ala Thr Leu Glu Arg Glu Leu Trp Lys His Gln

180 185 190
Lys Ala Asn Glu Ala Phe Gln Lys Ala Leu Arg Glu Ile Gly Ser Ile
195 200 205
Val Thr Ala Ala Ala Arg Gly Asp Leu Ser Lys Arg Val Lys Ile Asn
210 215 220
Pro Ile Glu Met Asp Pro Glu Ile Thr Thr Phe Lys Arg Thr Met Asn
225 230 235 240
Ala Met Met Asp Gln Leu Gly Val Phe Ser Ser Glu Val Ser Arg Val
245 250 255
Ala Arg Glu Val Gly Thr Glu Gly Ile Leu Gly Gly Gln Ala Gln Ile
260 265 270
Glu Gly Val Asp Gly Thr Trp Lys Glu Leu Thr Asp Asn Val Asn Val
275 280 285
Met Ala Gln Asn Leu Thr Asp Gln Val Arg Glu Ile Ala Ser Val Thr
290 295 300
Thr Ala Val Ala His Gly Asp Leu Thr Gln Lys Ile Glu Ser Ala Ala
305 310 315 320
Lys Gly Glu Ile Leu Gln Leu Gln Gln Thr Ile Asn Thr Met Val Asp
325 330 335
Gln Leu Arg Thr Phe Ala Ser Glu Val Thr Arg Val Ala Arg Asp Val
340 345 350
Gly Thr Glu Gly Met Leu Gly Gly Gln Ala Asp Val Glu Gly Val Lys
355 360 365
Gly Met Trp Asn Glu Leu Thr Val Asn Val Asn Ala Met Ala Asn Asn
370 375 380
Leu Thr Thr Gln Val Arg Asp Ile Ile Asn Val Thr Thr Ala Val Ala
385 390 395 400
Lys Gly Asp Leu Thr Gln Lys Val Gln Ala Glu Cys Arg Gly Glu Ile
405 410 415

Phe Glu Leu Lys Asn Thr Ile Asn Ser Met Val Asp Gln Leu Gln Gln
 420 425 430
 Phe Ala Arg Glu Val Thr Lys Ile Ala Arg Glu Val Gly Thr Glu Gly
 435 440 445
 Arg Leu Gly Gly Gln Ala Thr Val His Asp Val Gln Gly Thr Trp Arg
 450 455 460
 Asp Leu Thr Glu Asn Val Asn Gly Met Ala Met Asn Leu Thr Thr Gln
 465 470 475 480
 Val Arg Glu Ile Ala Asn Val Thr Ser Ala Val Ala Ala Gly Asp Leu
 485 490 495
 Ser Lys Lys Ile Arg Val Glu Val Lys Gly Glu Ile Leu Asp Leu Lys
 500 505 510
 Asn Thr Ile Asn Thr Met Val Asp Arg Leu Gly Thr Phe Ala Phe Glu
 515 520 525
 Val Ser Lys Val Ala Arg Ala Val Gly Thr Asp Gly Thr Leu Gly Gly
 530 535 540
 Gln Ala Gln Val Glu Asn Val Glu Gly Lys Trp Lys Asp Leu Thr Glu
 545 550 555 560
 Asn Val Asn Thr Met Ala Ser Asn Leu Thr Ser Gln Val Arg Gly Ile
 565 570 575
 Ser Thr Val Thr Gln Ala Ile Ala Asn Gly Asp Met Ser Arg Lys Ile
 580 585 590
 Asp Val Glu Ala Lys Gly Glu Ile Leu Ile Leu Lys Glu Thr Ile Asn
 595 600 605
 Asn Met Val Asp Arg Leu Ser Ile Phe Cys Asn Glu Val Gln Arg Val
 610 615 620
 Ala Lys Asp Val Gly Val Asp Gly Ile Met Gly Gly Gln Ala Asp Val
 625 630 635 640
 Ala Gly Leu Lys Gly Arg Trp Lys Glu Ile Thr Thr Asp Val Asn Thr

645	650	655
Met Ala Asn Asn Leu Thr Ala Gln Val Arg Ala Phe Gly Asp Ile Thr		
660	665	670
Asn Ala Ala Thr Asp Gly Asp Phe Thr Lys Leu Val Glu Val Glu Ala		
675	680	685
Ser Gly Glu Met Asp Glu Leu Lys Arg Lys Ile Asn Gln Met Val Tyr		
690	695	700
Asn Leu Arg Asp Ser Ile Gln Arg Asn Thr Gln Ala Arg Glu Ala Ala		
705	710	715
Glu Leu Ala Asn Lys Thr Lys Ser Glu Phe Leu Ala Asn Met Ser His		
725	730	735
Glu Ile Arg Thr Pro Met Asn Gly Ile Ile Gly Met Thr Gln Leu Thr		
740	745	750
Leu Asp Thr Asp Leu Thr Gln Tyr Gln Arg Glu Met Leu Asn Ile Val		
755	760	765
Asn Asn Leu Ala Met Ser Leu Leu Thr Ile Ile Asp Asp Ile Leu Asp		
770	775	780
Leu Ser Lys Ile Glu Ala Lys Arg Met Val Ile Glu Glu Ile Pro Tyr		
785	790	795
Thr Leu Arg Gly Thr Val Phe Asn Ala Leu Lys Thr Leu Ala Val Lys		
805	810	815
Ala Asn Asp Lys Phe Leu Asp Leu Thr Tyr Arg Val Asp Ser Ser Val		
820	825	830
Pro Asp His Val Ile Gly Asp Ser Phe Arg Leu Arg Gln Ile Ile Leu		
835	840	845
Asn Leu Val Gly Asn Ala Ile Lys Phe Thr Glu His Gly Glu Val Ser		
850	855	860
Leu Thr Ile Gln Lys Gly Asn Asp Val Thr Cys Leu Pro Asn Glu Tyr		
865	870	875
		880

Met Ile Glu Phe Val Val Ser Asp Thr Gly Ile Gly Ile Pro Thr Asp
 885 890 895
 Lys Leu Gly Leu Ile Phe Asp Thr Phe Gln Gln Ala Asp Gly Ser Met
 900 905 910
 Thr Arg Lys Phe Gly Gly Thr Gly Leu Gly Leu Ser Ile Ser Lys Arg
 915 920 925
 Leu Val Asn Leu Met Gly Gly Asp Val Trp Val Lys Ser Gln Tyr Gly
 930 935 940
 Lys Gly Ser Ser Phe Tyr Phe Thr Cys Arg Val Arg Leu Ala Asp Val
 945 950 955 960
 Asp Ile Ser Leu Ile Arg Lys Gln Leu Lys Pro Tyr Lys Gly His Gln
 965 970 975
 Val Leu Phe Ile Asp Lys Gly Lys Thr Gly His Gly Pro Glu Val Gly
 980 985 990
 Gln Met Leu Gly Gln Leu Gly Leu Val Pro Ile Val Leu Glu Ser Glu
 995 1000 1005
 Gln Asn His Thr Leu Thr Arg Val Arg Gly Lys Glu Cys Pro Tyr Asp
 1010 1015 1020
 Val Ile Val Val Asp Ser Ile Asp Thr Ala Arg Arg Leu Arg Gly Ile
 1025 1030 1035 1040
 Asp Asp Phe Lys Tyr Leu Pro Ile Val Leu Leu Ala Pro Thr Val His
 1045 1050 1055
 Val Ser Leu Lys Ser Cys Leu Asp Leu Gly Ile Thr Ser Tyr Met Thr
 1060 1065 1070
 Met Pro Cys Lys Leu Ile Asp Leu Gly Asn Gly Met Val Pro Ala Leu
 1075 1080 1085
 Glu Asn Arg Ala Thr Pro Ser Leu Ser Asp Asn Thr Lys Ser Phe Glu
 1090 1095 1100
 Ile Leu Leu Ala Glu Asp Asn Thr Val Asn Gln Arg Leu Ala Val Lys

1105	1110	1115	1120
Ile Leu Glu Lys Tyr Asn His Val Val Thr Val Val Ser Asn Gly Ala			
1125	1130	1135	
Glu Ala Leu Glu Ala Val Lys Asp Asn Lys Tyr Asp Val Ile Leu Met			
1140	1145	1150	
Asp Val Gln Met Pro Val Met Gly Gly Phe Glu Ala Thr Ala Lys Ile			
1155	1160	1165	
Arg Glu Tyr Glu Arg Ser Leu Gly Thr Gln Arg Thr Pro Ile Ile Ala			
1170	1175	1180	
Leu Thr Ala His Ala Met Met Gly Asp Arg Glu Lys Cys Ile Glu Ala			
1185	1190	1195	1200
Gln Met Asp Glu Tyr Leu Ser Lys Pro Leu Gln Gln Asn His Leu Ile			
1205	1210	1215	
Gln Thr Ile Leu Lys Cys Ala Thr Leu Gly Gly Ala Leu Leu Glu Gln			
1220	1225	1230	
Asn Arg Glu Arg Glu Leu Glu Leu Ala Arg His Ala Glu His Lys Gly			
1235	1240	1245	
Gly Leu Ser Thr Asp Pro Ala Arg Ala Ser Ser Val Met Arg Pro Pro			
1250	1255	1260	
Leu His His Arg Pro Val Thr Thr Ala Glu Ser Leu Ser Gly Gly Ala			
1265	1270	1275	1280
Glu Ser Pro Ser Leu Met Ala Asn Asp Gly Glu Asp Pro Ile Gln Arg			
1285	1290	1295	
Ala Arg Ser Ser Leu Ser Glu Pro Gly Cys Leu			
1300	1305		

<210> 17

<211> 3924

<212> DNA

<213> Magnaporthe grisea

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(3924)

<400> 17

atg gcg gac gcg gcg act ctg gca gct gtc gct gcg att gtg gag aat 48

Met Ala Asp Ala Ala Thr Leu Ala Ala Val Ala Ala Ile Val Glu Asn

1

5

10

15

atc gct acc aac tcg ggg gcc cct gga aaa aat gct tca ttt cgc tcc 96

Ile Ala Thr Asn Ser Gly Ala Pro Gly Lys Asn Ala Ser Phe Arg Ser

20

25

30

agt acc tat gtc cag ctt ccc ggt ccg gaa tcc gac gag aag aaa cag 144

Ser Thr Tyr Val Gln Leu Pro Gly Pro Glu Ser Asp Glu Lys Lys Gln

35

40

45

ctc gag cgc gag ctt gcc gcc ctg gtg ata agg gta cag cag ctc gaa 192

Leu Glu Arg Glu Leu Ala Ala Leu Val Ile Arg Val Gln Gln Leu Glu

50

55

60

acc cgt gcc aac gcg gct cct gct aca ata ttc ccc gac aca ccc aac 240

Thr Arg Ala Asn Ala Ala Pro Ala Thr Ile Phe Pro Asp Thr Pro Asn

65

70

75

80

gaa act gca cat tca ctc ttt ggc gat gat agc tcg tcc cct acc agt 288

Glu Thr Ala His Ser Leu Phe Gly Asp Asp Ser Ser Ser Pro Thr Ser
 85 90 95

tcg agc tca ggc cgg gag cct aaa cga ctg aag tcg gca tcc agc aca 336
 Ser Ser Ser Gly Arg Glu Pro Lys Arg Leu Lys Ser Ala Ser Ser Thr
 100 105 110

acg agg aat ggt ttc act acg gac ggt cgt cca tca aag ctc aac gca 384
 Thr Arg Asn Gly Phe Thr Thr Asp Gly Arg Pro Ser Lys Leu Asn Ala
 115 120 125

atc acc gat gag gag ctc gaa ggc ttg cgc gaa cat gtt gac ggc cag 432
 Ile Thr Asp Glu Glu Leu Glu Gly Leu Arg Glu His Val Asp Gly Gln
 130 135 140

tcc cgg ctg ctc gac agc caa agg gcc gag ctg gac ggc gtc aat gcc 480
 Ser Arg Leu Leu Asp Ser Gln Arg Ala Glu Leu Asp Gly Val Asn Ala
 145 150 155 160

caa ctc ttg gag cag aag cag ctg caa gag cgc gcc ctt gcc ata atc 528
 Gln Leu Leu Glu Gln Lys Gln Leu Gln Glu Arg Ala Leu Ala Ile Ile
 165 170 175

gag cag gaa cgt gta gcc act ttg gag aga gag cta tgg aaa cat caa 576
 Glu Gln Glu Arg Val Ala Thr Leu Glu Arg Glu Leu Trp Lys His Gln
 180 185 190

aag gcc aac gag gcc ttc cag aag gct ctc cgg gag att gga tcg ata 624
 Lys Ala Asn Glu Ala Phe Gln Lys Ala Leu Arg Glu Ile Gly Ser Ile

195	200	205	
gtg acc gct gca gcc cgg ggt gac ctc tct aag agg gtc aag ata aac			672
Val Thr Ala Ala Ala Arg Gly Asp Leu Ser Lys Arg Val Lys Ile Asn			
210	215	220	
ccg att gag atg gac cct gaa atc acc aca ttc aag agg acc atg aac			720
Pro Ile Glu Met Asp Pro Glu Ile Thr Thr Phe Lys Arg Thr Met Asn			
225	230	235	240
gcc atg atg gat caa ctt ggc gtc ttc tct agt gaa gtc tcg cga gtg			768
Ala Met Met Asp Gln Leu Gly Val Phe Ser Ser Glu Val Ser Arg Val			
245	250	255	
gca aga gag gtc ggc acc gag ggc ata tta ggt gga cag gcc cag atc			816
Ala Arg Glu Val Gly Thr Glu Gly Ile Leu Gly Gly Gln Ala Gln Ile			
260	265	270	
gag gga gtg gac ggc acg tgg aaa gaa ctg acg gac aat gtc aac gtc			864
Glu Gly Val Asp Gly Thr Trp Lys Glu Leu Thr Asp Asn Val Asn Val			
275	280	285	
atg gcg cag aac ctg acc gac caa gtc cgc gaa atc gcc tca gtc act			912
Met Ala Gln Asn Leu Thr Asp Gln Val Arg Glu Ile Ala Ser Val Thr			
290	295	300	
aca gct gtg gcc cac gga gat ttg acc caa aag att gag agt gcg gcc			960
Thr Ala Val Ala His Gly Asp Leu Thr Gln Lys Ile Glu Ser Ala Ala			
305	310	315	320

aag gga gaa atc cta cag ctt caa caa act ata aat acc atg gtg gac 1008

Lys Gly Glu Ile Leu Gln Leu Gln Gln Thr Ile Asn Thr Met Val Asp

325

330

335

caa cta cgc aca ttt gct tca gag gtt acc cgt gtc gcc cgt gac gtc 1056

Gln Leu Arg Thr Phe Ala Ser Glu Val Thr Arg Val Ala Arg Asp Val

340

345

350

gga acc gag gga atg ctc ggc ggg cag gct gac gtt gaa ggg gtc aag 1104

Gly Thr Glu Gly Met Leu Gly Gly Gln Ala Asp Val Glu Gly Val Lys

355

360

365

ggc atg tgg aat gag ctg acg gtc aac gtc aac gcc atg gcc aac aat 1152

Gly Met Trp Asn Glu Leu Thr Val Asn Val Asn Ala Met Ala Asn Asn

370

375

380

tta aca acc caa gtg cgc gac atc atc aac gtt acc aca gcc gtc gca 1200

Leu Thr Thr Gln Val Arg Asp Ile Ile Asn Val Thr Thr Ala Val Ala

385

390

395

400

aag gga gat ctt aca caa aag gtg cag gcg gaa tgt cgc ggc gag att 1248

Lys Gly Asp Leu Thr Gln Lys Val Gln Ala Glu Cys Arg Gly Glu Ile

405

410

415

ttt gag ctc aag aac acg atc aat tcc atg gtg gac cag ctg cag caa 1296

Phe Glu Leu Lys Asn Thr Ile Asn Ser Met Val Asp Gln Leu Gln Gln

420

425

430

ttt gct cgc gag gtt acc aag atc gcc aga gag gtt ggt acc gaa gga 1344

Phe Ala Arg Glu Val Thr Lys Ile Ala Arg Glu Val Gly Thr Glu Gly

435

440

445

cgg ctg ggc ggc caa gca act gtt cac gat gta cag gga act tgg cga 1392

Arg Leu Gly Gly Gln Ala Thr Val His Asp Val Gln Gly Thr Trp Arg

450

455

460

gat ctc aca gaa aac gtg aac gga atg gct atg aat ctc acc aca caa 1440

Asp Leu Thr Glu Asn Val Asn Gly Met Ala Met Asn Leu Thr Thr Gln

465

470

475

480

gta cga gag ata gcc aat gtt acc agt gcc gtc gct gca ggc gac cta 1488

Val Arg Glu Ile Ala Asn Val Thr Ser Ala Val Ala Ala Gly Asp Leu

485

490

495

tcc aag aag atc agg gta gag gtc aag ggc gag att ctg gac ctc aaa 1536

Ser Lys Lys Ile Arg Val Glu Val Lys Gly Glu Ile Leu Asp Leu Lys

500

505

510

aat acc atc aac acc atg gtt gac cgc ctc gga act ttc gcc ttc gaa 1584

Asn Thr Ile Asn Thr Met Val Asp Arg Leu Gly Thr Phe Ala Phe Glu

515

520

525

gtc agc aaa gta gcc cga gcc gtc ggc aca gat ggc act ctt ggt ggt 1632

Val Ser Lys Val Ala Arg Ala Val Gly Thr Asp Gly Thr Leu Gly Gly

530

535

540

cag gct caa gtt gag aat gtg gag ggc aaa tgg aaa gac ctc acc gaa 1680

Gln Ala Gln Val Glu Asn Val Glu Gly Lys Trp Lys Asp Leu Thr Glu
545 550 555 560

aac gtc aac acc atg gcg tca aac ctc act tct cag gtc agg gga ata 1728
Asn Val Asn Thr Met Ala Ser Asn Leu Thr Ser Gln Val Arg Gly Ile
565 570 575

tca acc gtg aca caa gcc atc gcg aac ggt gac atg agc cga aag atc 1776
Ser Thr Val Thr Gln Ala Ile Ala Asn Gly Asp Met Ser Arg Lys Ile
580 585 590

gac gtg gaa gcc aag ggc gag ata cta atc ctc aag gaa act atc aac 1824
Asp Val Glu Ala Lys Gly Glu Ile Leu Ile Leu Lys Glu Thr Ile Asn
595 600 605

aac atg gtt gat cgt ctg tcg ata ttc tgc aat gaa gta caa cga gtc 1872
Asn Met Val Asp Arg Leu Ser Ile Phe Cys Asn Glu Val Gln Arg Val
610 615 620

gca aaa gat gta ggc gtt gat ggc att atg ggg gga caa gcc gac gtt 1920
Ala Lys Asp Val Gly Val Asp Gly Ile Met Gly Gly Gln Ala Asp Val
625 630 635 640

gca ggt ctc aag ggg cga tgg aag gag att acc acc gat gtc aac acc 1968
Ala Gly Leu Lys Gly Arg Trp Lys Glu Ile Thr Thr Asp Val Asn Thr
645 650 655

atg gcc aac aat ctt acg gcg caa gta cgc gct ttc gga gat ata acc 2016
Met Ala Asn Asn Leu Thr Ala Gln Val Arg Ala Phe Gly Asp Ile Thr

660	665	670	
aat gcc gct acc gac gga gac ttc acc aag ctg gtc gag gtt gag gcg			2064
Asn Ala Ala Thr Asp Gly Asp Phe Thr Lys Leu Val Glu Val Glu A			
675	680	685	
tcg ggc gaa atg gac gaa ctg aag cgc aag atc aat caa atg gtc tac			2112
Ser Gly Glu Met Asp Glu Leu Lys Arg Lys Ile Asn Gln Met Val Tyr			
690	695	700	
aat ctc cga gac agt atc caa aga aac acg caa gca aga gaa gcc gca			2160
Asn Leu Arg Asp Ser Ile Gln Arg Asn Thr Gln Ala Arg Glu Ala Ala			
705	710	715	720
gaa ttg gcc aac aag acg aag tcg gag ttc ctc gct aac atg tcc cac			2208
Glu Leu Ala Asn Lys Thr Lys Ser Glu Phe Leu Ala Asn Met Ser His			
725	730	735	
gaa atc cgc aca ccc atg aac ggt atc atc ggc atg aca caa ctt act			2256
Glu Ile Arg Thr Pro Met Asn Gly Ile Ile Gly Met Thr Gln Leu Thr			
740	745	750	
ctt gat aca gat ttg acg caa tac caa cgc gaa atg ctc aac att gtc			2304
Leu Asp Thr Asp Leu Thr Gln Tyr Gln Arg Glu Met Leu Asn Ile Val			
755	760	765	
aac aat ctc gcc atg agt ctg ctc acc att atc gac gac atc ctc gat			2352
Asn Asn Leu Ala Met Ser Leu Leu Thr Ile Ile Asp Asp Ile Leu Asp			
770	775	780	

ctg tca aag att gag gct aag cgg atg gtt atc gag gag att cca tac 2400
 Leu Ser Lys Ile Glu Ala Lys Arg Met Val Ile Glu Glu Ile Pro Tyr
 785 790 795 800

acg tta cga gga acg gtc ttc aac gca ctg aag act ttg gcg gtc aag 2448
 Thr Leu Arg Gly Thr Val Phe Asn Ala Leu Lys Thr Leu Ala Val Lys
 805 810 815

gcg aac gac aag ttt ttg gat ctc acg tac cgt gtg gac agc tca gtt 2496
 Ala Asn Asp Lys Phe Leu Asp Leu Thr Tyr Arg Val Asp Ser Ser Val
 820 825 830

cct gac cac gtc atc ggt gac tcg ttc cgt ctg cgc cag att atc ctg 2544
 Pro Asp His Val Ile Gly Asp Ser Phe Arg Leu Arg Gln Ile Ile Leu
 835 840 845

aac ctg gtt ggc aat gcc atc aaa ttc acc gag cat gga gag gtc agc 2592
 Asn Leu Val Gly Asn Ala Ile Lys Phe Thr Glu His Gly Glu Val Ser
 850 855 860

ctt act atc cag aag ggc aac gac gtg acg tgc ctg cca aac gag tac 2640Le
 u Thr Ile Gln Lys Gly Asn Asp Val Thr Cys Leu Pro Asn Glu Tyr
 865 870 875 880

atg atc gaa ttt gtc gtg tcg gac acg ggc ata gga att cca acg gac 2688
 Met Ile Glu Phe Val Val Ser Asp Thr Gly Ile Gly Ile Pro Thr Asp
 885 890 895

aaa ctg ggt ctc atc ttc gac aca ttc cag cag gct gat gga tcc atg 2736
Lys Leu Gly Leu Ile Phe Asp Thr Phe Gln Gln Ala Asp Gly Ser Met
900 905 910

aca cgc aag ttt ggc gga acc ggg ctt ggt ctg tct att tcc aag agg 2784
Thr Arg Lys Phe Gly Gly Thr Gly Leu Gly Leu Ser Ile Ser Lys Arg
915 920 925

ctc gtc aac ctc atg ggc ggt gac gtg tgg gtc aag tca caa tac ggc 2832
Leu Val Asn Leu Met Gly Gly Asp Val Trp Val Lys Ser Gln Tyr Gly
930 935 940

aag ggc agc tcg ttc tac ttc act tgt cgt gtc cgc ctc gcc gac gtg 2880
Lys Gly Ser Ser Phe Tyr Phe Thr Cys Arg Val Arg Leu Ala Asp Val
945 950 955 960

gat atc tca ctc atc agg aag cag ctg aag cct tac aag gga cac cag 2928
Asp Ile Ser Leu Ile Arg Lys Gln Leu Lys Pro Tyr Lys Gly His Gln
965 970 975

gtc ctg ttc atc gat aag ggc aag act gga cac ggg ccc gag gtg ggg 2976
Val Leu Phe Ile Asp Lys Gly Lys Thr Gly His Gly Pro Glu Val Gly
980 985 990

cag atg ctc ggc cag ctg ggt ttg gtg ccc atc gtg ctg gaa tcc gag 3024
Gln Met Leu Gly Gln Leu Gly Leu Val Pro Ile Val Leu Glu Ser Glu
995 1000 1005

caa aat cac acc ctg acg cgg gtg cgc ggc aag gaa tgt ccc tac gac 3072

Gln Asn His Thr Leu Thr Arg Val Arg Gly Lys Glu Cys Pro Tyr Asp

1010

1015

1020

gtg ata gtt gtc gac tca atc gac aca gcc cgg cgc ctg aga gga att 3120

Val Ile Val Val Asp Ser Ile Asp Thr Ala Arg Arg Leu Arg Gly Ile

1025

1030

1035

1040

gac gac ttc aag tat ctg ccc atc gtt ctc ctg gcg cca act gtc cac 3168

Asp Asp Phe Lys Tyr Leu Pro Ile Val Leu Leu Ala Pro Thr Val His

1045

1050

1055

gtc agc ctg aaa tcc tgc ttg gac ttg ggt att acc tcg tat atg acg 3216

Val Ser Leu Lys Ser Cys Leu Asp Leu Gly Ile Thr Ser Tyr Met Thr

1060

1065

1070

atg ccc tgc aag ctc atc gac ctc ggc aat ggt atg gtt ccc gct ctt 3264

Met Pro Cys Lys Leu Ile Asp Leu Gly Asn Gly Met Val Pro Ala Leu

1075

1080

1085

gag aac cgt gcc aca cca tca cta tca gac aac act aag tcg ttc gaa 3312

Glu Asn Arg Ala Thr Pro Ser Leu Ser Asp Asn Thr Lys Ser Phe Glu

1090

1095

1100

att ctg ctg gcc gag gac aac acc gtc aac cag cgc ctg gcc gtt aag 3360

Ile Leu Leu Ala Glu Asp Asn Thr Val Asn Gln Arg Leu Ala Val Lys

1105

1110

1115

1120

att ctt gaa aag tac aac cac gtt gtg acg gta gtc agc aac ggt gct 3408

Ile Leu Glu Lys Tyr Asn His Val Val Thr Val Val Ser Asn Gly Ala

1125	1130	1135	
gaa gct ctt gaa gct gtc aag gat aac aaa tac gat gtg atc ctg atg 3456			
Glu Ala Leu Glu Ala Val Lys Asp Asn Lys Tyr Asp Val Ile Leu Met			
1140	1145	1150	
gat gtt caa atg cct gtc atg ggt gga ttt gag gcg acg gca aag att 3504			
Asp Val Gln Met Pro Val Met Gly Gly Phe Glu Ala Thr Ala Lys Ile			
1155	1160	1165	
cgt gaa tac gag cgc agc ctg ggc aca cag agg aca cca atc atc gcg 3552			
Arg Glu Tyr Glu Arg Ser Leu Gly Thr Gln Arg Thr Pro Ile Ile Ala			
1170	1175	1180	
ctt acc gct cac gca atg atg ggc gac cgt gag aag tgt atc gag gcc 3600			
Leu Thr Ala His Ala Met Met Gly Asp Arg Glu Lys Cys Ile Glu Ala			
1185	1190	1195	1200
cag atg gac gag tac ctg tcg aag cct ctg cag cag aac cac ttg ata 3648			
Gln Met Asp Glu Tyr Leu Ser Lys Pro Leu Gln Gln Asn His Leu Ile			
1205	1210	1215	
caa aca att ctc aag tgt gca acg ctg ggt ggc gcc ttg ttg gaa caa 3696			
Gln Thr Ile Leu Lys Cys Ala Thr Leu Gly Gly Ala Leu Leu Glu Gln			
1220	1225	1230	
aat cgt gag cgc gag ctt gaa cta gca agg cat gcc gaa cac aaa gga 3744			
Asn Arg Glu Arg Glu Leu Glu Leu Ala Arg His Ala Glu His Lys Gly			
1235	1240	1245	

gga ctg tct acg gac ccg gcg agg gca tcg tcg gta atg cgt ccg cca 3792

Gly Leu Ser Thr Asp Pro Ala Arg Ala Ser Ser Val Met Arg Pro Pro

1250

1255

1260

cta cac cac cga ccg gtg act aca gcc gag tcg ctt tct ggt ggc gcc 3840

Leu His His Arg Pro Val Thr Thr Ala Glu Ser Leu Ser Gly Gly Ala

1265

1270

1275

1280

gaa agc ccc tcg ttg atg gca aat gac ggc gaa gat cca ata caa agg 3888

Glu Ser Pro Ser Leu Met Ala Asn Asp Gly Glu Asp Pro Ile Gln Arg

1285

1290

1295

gca cgt agc agt ctc tct gaa cca gga tgc cta taa 3924

Ala Arg Ser Ser Leu Ser Glu Pro Gly Cys Leu Stop

1300

1305

<210> 18

<211> 34

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Designed
oligonucleotide primer for PCR

<400> 18

acgactagta tggcggacgc cgcgactctg gcag

34

<210> 19

<211> 34

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Designed
oligonucleotide primer for PCR

<400> 19

ctgaagcttt tataggcatc ctgtttcaga gaga 34

<210> 20

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Designed
oligonucleotide primer for Sequencing

<400> 20

ttcactacgg acggtcgtcc atcaa 25

<210> 21

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Designed
oligonucleotide primer for sequencing

<400> 21

ttaggtggac aggccagat cgagg 25

<210> 22

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Designed
oligonucleotide primer for sequencing

<400> 22

tcaagaacac gatcaattcc atggt 25

<210> 23

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Designed
oligonucleotide primer for sequencing

<400> 23

gtcaaacctc agcttctcag gtcag 25

<210> 24

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Designed
oligonucleotide primer for sequencing

<400> 24

ccaacaagac gaagtcggag ttcct 25

<210> 25

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Designed

oligonucleotide primer for sequencing

<400> 25

cgtgacgtgc ctgccaacg agtac 25

<210> 26

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Designed
oligonucleotide primer for sequencing

<400> 26

atagttgtcg actcaatcga cacag 25

<210> 27

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Designed
oligonucleotide primer for sequencing

<400> 27

acagaggaca ccaatcatcg cgctt

25

<210> 28

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Designed
oligonucleotide primer for sequencing

<400> 28

gttttccag tcacgac

17

<210> 29

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Designed
oligonucleotide primer for sequencing

<400> 29

caggaaacag ctatgac

17

【書類名】 要約書

【要約】

【課題】

OS-1遺伝子等を用いた新たな抗菌活性検定方法等を開発すること。

【解決手段】

少なくとも1つ以上のハイブリッドセンサーキナーゼを欠損した細胞に、細胞膜貫通領域を有さない浸透圧感受性ヒスチジンキナーゼの遺伝子が機能可能な形で導入されてなることを特徴とする形質転換細胞、及び、

物質の抗菌活性検定方法であって、上記の形質転換細胞に被験物質を接触させる工程、当該工程後前記形質転換細胞を培養する工程、当該工程で培養された形質転換細胞内で発現された細胞膜貫通領域を有さない浸透圧感受性ヒスチジンキナーゼからの細胞内信号伝達量又はそれに相関関係を有する指標値を測定する工程、当該工程で測定された細胞内信号伝達量又はそれに相関関係を有する指標値と対照との差異に基づき前記被験物質の抗菌活性を評価する工程、を有することを特徴とする検定方法等。

【選択図】 なし

特願 2002-317736

出願人履歴情報

識別番号

[000002093]

1. 変更年月日
[変更理由]

住 所
氏 名

1990年 8月28日
新規登録
大阪府大阪市中央区北浜4丁目5番33号
住友化学工業株式会社

2. 変更年月日
[変更理由]

住 所
氏 名

2003年 5月 8日
名称変更
住所変更
大阪府大阪市中央区北浜4丁目5番33号
住友化学工業株式会社